

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



NUEVAS DIANAS MOLECULARES DE LA INFLAMACIÓN
EN MODELOS DE DAÑO RENAL.
ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN TERAPÉUTICA

Cristian González Guerrero

Tesis Doctoral

Madrid, 2017

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CRISTIAN GONZÁLEZ GUERRERO
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
MÁSTER EN BIOMEDICINA

DIRECTOR: Dr. Adrián M. Ramos
CO-DIRECTOR: Dr. Alberto Ortiz Arduán

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA - FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
LABORATORIO DE NEFROLOGÍA EXPERIMENTAL Y PATOLOGÍA VASCULAR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

A mi Gran Familia

A Miriam

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

En este trabajo de tesis caracterizamos mecanismos moleculares de la inflamación renal y de respuestas accesorias inducidas por inmunosupresores de la familia de los anticalcineurínicos (ACNs) los cuales actuarían como inductoras de respuestas patogénicas asociadas a la nefrotoxicidad. En un modelo *in vivo* de nefrotoxicidad progresiva por CsA, observamos en el riñón incrementos de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, activación endotelial e infiltración de leucocitos desde etapas iniciales del tratamiento y de manera anticipada a la aparición de fibrosis. En este modelo, la inhibición de la quimioquina CCL20, identificada como una de las citoquinas con mayor expresión diferencial en el riñón de animales bajo tratamiento con CsA, resultó en un aparente mayor grado de inflamación y aceleración de la fibrosis. Además, el bloqueo de CCL20 resultó en menor infiltración renal de linfocitos Th17, pero no influyó en la respuesta Treg, ausente en el infiltrado inflamatorio de los ratones tratados con CsA.

El bloqueo farmacológico *in vivo* o el tratamiento de ratones TLR4^{-/-} mejoró la inflamación, el daño tubular y la función renal de los animales tratados con CsA. En estudios *in vivo* e *in vitro*, CsA promovió la secreción de HMGB1, principal mediador endógeno de TLR4, y la inhibición del tránsito de HMGB1 impidió la síntesis de citoquinas proinflamatorias en células tubulares. La inactivación de TLR4 también inhibió la activación de la respuesta UPR ligada al estrés del retículo endoplásmico, que demostramos ser un mediador de la respuesta inflamatoria inducida por los ACNs. A nivel vascular, la inhibición farmacológica de TLR4 suprimió la respuesta inflamatoria inducida por ACNs en cultivos de células endoteliales y vasculares, y en cultivos *ex vivo* de aortas murinas. Una menor respuesta inflamatoria también se confirmó en aortas provenientes de ratones TLR4^{-/-} sometidas al tratamiento con ACNs. Por otra parte, en modelos inflamatorios de sepsis renal *in vivo* y en cultivo de células intrínsecas del riñón y macrófagos, la nanomedicina QM56 suprimió efectos proinflamatorios inducidos por señalización por TLR4 mediante la inhibición de la actividad de MAPKs.

En conclusión, los ACNs desencadenan una respuesta inflamatoria renal y vascular mayoritariamente dependiente de la activación de TLR4 y que en el caso del riñón conduce a la fibrosis. Por lo tanto, TLR4 podría constituir una potencial diana terapéutica para tratamientos adyuvantes que pudieran prevenir la toxicidad renal y vascular dependiente de ACNs. Nanomedicinas de la familia de los polímeros terapéuticos podrían ser de utilidad en la inhibición de la señalización patogénica por TLR4.

SUMMARY

In this thesis work, we focused on the characterization of the molecular mechanisms of renal and vascular inflammation and associated responses induced by calcineurin inhibitors (CNIs). A murine model of progressive nephrotoxicity induced by CsA showed upregulation of renal proinflammatory cytokines and chemokines and endothelial activation proteins and also leukocyte kidney influx from early stages onwards and also previous to fibrosis onset. In this model, renal expression of the chemokine CCL20 was particularly high in CsA treated mice. Moreover, CCL20 blockade in these mice group resulted in amplification of the inflammatory process and anticipation of renal fibrosis. Moreover, CCL20 blockade led to a lesser renal Th17 lymphocyte infiltration whereas it did not affect the Treg response which otherwise remained absent in CsA-treated mice.

Both *in vivo*, pharmacological inhibition and the absence of TLR4 expression ameliorated CNI-induced inflammation, tubular damage and renal function. HMGB1, the main TLR4 endogenous ligand, was secreted in response to CsA both *in vivo* and *in vitro* experimental models. Moreover, HMGB1 nuclear-cytoplasmic transit inhibition, impeded proinflammatory cytokine expression in tubular cells. Furthermore, TLR4 suppression blocked endoplasmic reticulum stress and the unfolding protein response (UPR) activation by CNIs which participate in the CNI-induced inflammatory response. On the other hand, TLR4 pharmacological inhibition suppressed the CNI-induced inflammatory response in endothelial and smooth muscle vascular cells, and also in *ex vivo* model of mouse aorta. Experiments performed in aortas from TLR4^{-/-} mice treated with CNIs, confirmed a lower inflammatory response.

Otherwise, the nanomedicine QM56 abolished the TLR4-dependent CNI-induced proinflammatory response through MAPK activity inhibition, both in a renal sepsis *in vivo* model and in relevant cell types involved in kidney injury, namely tubular and endothelial cells and also macrophages.

In conclusion, results of this study show that CNIs trigger a TLR4-dependent renal inflammatory response leading to fibrosis. In addition, TLR4 also mediated CNI inflammatory responses at the vascular level. In such a way, TLR4 could potentially be a relevant pharmacological target for adjuvant therapies aiming to prevent CNI toxic side effects. In addition, polymer-drug conjugates nanomedicines could result in a novel therapy against pathogenic TLR4 signaling.

LISTADO DE ABREVIATURAS

Relación de acrónimos y abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente uso en el lenguaje científico y a la dificultad en su traducción.

ACNs	Anticalcineurínicos o Inhibidores de Calcineurina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
AP-1	Activated Protein-1
Apaf-1	Apoptosis Protease-Activating Factor-1
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ATF3	Activating Transcription Factor 3
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
CCL2/MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
CCL20/MIP3- α	Macrophage Inflammatory Protein-3 α
CCL5/Rantes	Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
CCR6	C-C Chemokine Receptor 6
CD	Cluster of Differentiation
CD31/PECAM-1	Platelet and Endothelial Cell Adhesion molecule-1
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CMLV	Células de Músculo Liso Vascular
COL-1	Colágeno tipo 1
CsA	Ciclosporina A
CTGF	Connective Tissue Growth Factor/Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
CXCL10/IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DCs	Dendritic Cells/Células Dendríticas
DHE	Dihidroetidio
EEM	Error Estándar de la Media
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2 α
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ERAD	Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ERT	Enfermedad Renal Terminal
ET-1	Endotelin-1/Endotelina-1
FasL	Fas Ligando
FN-1	Fibronectina tipo-1
Fn14	Fibroblast Growth Factor-Inducible 14
FOXP3	Forkhead Box P3
FRA	Fracaso Renal Agudo
GAPDH	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
GFR	Glomerular Filtration Rate/Tasa de Filtrado Glomerular
H/E	Hematoxilina/Eosina
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HSPs	Heat Shock Proteins/Proteínas de Shock Térmico
I/R	Isquemia/Reperfusión
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1/Molécula de Adhesión Intercelular-1
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
IKB α	Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B cells Inhibitor α
IKK	IKB kinase
IL-1	Interleukin 1/Interleuquina 1
IL-10	Interleukin 10/Interleuquina 10
IL-17	Interleukin 17/Interleuquina 17
IL1 β	Interleukin 1 β /Interleuquina 1 β
IL-2	Interleukin 2/Interleuquina 2
IL-6	Interleukin 6/Interleuquina 6
INF- α	Interferon- α
INF- β	Interferon- β
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1
IRE1 α	Inositol-Requiring Protein 1
IRF3/IRF7	Interferon Regulator Factor 3/7
JAK2	Janus Kinase 2

JNK	c-Jun N-Terminal Kinase
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Leucin Rich Repeat Domain
LTA	Lipoteichoic Acid/Ácido Lipoteicoico
MAL	MyD88-Adapter-Like
MAPKs	Mitogen-Activated Protein-kinases
MCT	Murine Proximal Tubular Cells/Células Murinas de Túbulo Proximal
MEC	Matriz Extracelular
MHCII	Major Histocompatibility Complex II/Complejo Mayor de Histocompatibilidad II
MMP	Metaloproteasas
MPO	Mieloperoxidasa
MS1	Mile Sven 1
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF-KB	Nuclear Factor Kappa B
NGAL/LCN2	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NK	Natural Killer
p38	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1/Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBA	Phenil Butyric Acid/Ácido Fenil Butírico
PERK	RNA PKR-like ER Kinase
PFA	Paraformaldehído
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
RE	Retículo Endoplásmico
ROS	Reactive Oxygen Species/Especies Reactivas de Oxígeno
SBF	Suero Bovino Fetal
SELE	E-Selectina
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Tac	Tacrolimus
TAK	Transforming growth factor beta-activated kinase-1
TEM	Transición Epitelio Mesénquima
TGF-β	Transforming Growth Factor- β/Factor de Crecimiento Transformante-β

Th1	Linfocitos T Helper 1
Th17	Linfocitos T Helper 17
Th2	Linfocitos T Helper 2
TIRAP	TIR-domain containing Adapter Protein
TLR4 ^{-/-}	TLR4 knock out
TLRs	Toll Like Receptors
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α /Factor de Necrosis Tumoral- α
TRAF	Tumor Necrosis Receptor-Associated Factor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Treg	Linfocitos T Reguladores
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducer Interferon- β
TWEAK	TNF-like Weak Inducer of Apoptosis
UPR	Unfolding Protein Response
UUO	Unilateral Ureteral Obstruction/Obstrucción Unilateral del Uréter
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1/Molécula de Adhesión Vascular-1
VE-cadherin	Vascular Endothelial Cadherin/Cadherina Endotelial Vascular
WT	Wild-Type
XBP1	Xbox Binding Protein-1
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin/Actina- α de Músculo Liso

Índice

RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	13
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN.....	27
1. FISIOPATOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN RENAL.....	29
1.1 Generalidades.....	29
1.2 Principales tipos celulares involucrados en la inflamación renal.....	30
1.3 Inmunidad innata y adaptativa.....	32
1.3.1 <i>Receptores celulares</i>	32
1.3.2 <i>Mediadores solubles (citoquinas y quimioquinas) y moléculas de adhesión</i>	34
1.3.3 <i>Mediadores celulares</i>	36
1.4 Relación de la inflamación con otros procesos patológicos.....	39
1.4.1 Inflamación y lesión tubulointersticial y glomerular.....	39
1.4.2 Inflamación y fibrosis.....	40
1.5 Mecanismos proinflamatorios accesorios.....	43
1.5.1 Estrés oxidativo.....	43
1.5.2 Estrés de retículo endoplásmico y respuestas relacionadas.....	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
1. MODELOS EXPERIMENTALES.....	57
1.1 Animales empleados.....	57
1.2 Modelo progresivo de nefrotoxicidad por CsA.....	57
1.3 Modelo de nefrotoxicidad por CsA en cotratamiento con el inhibidor de TLR4.....	58
1.4 Modelo de nefrotoxicidad por CsA en ratones TLR4 ^{-/-}	58
1.5 Modelo de nefrotoxicidad por CsA con bloqueo de CCL20.....	59
1.6 Modelo de daño renal agudo por LPS con administración de QM56.....	59
1.7 Procesamiento de los tejidos.....	70
2. CULTIVOS CELULARES.....	60
2.1 Líneas celulares.....	60
2.2 Estímulos e inhibidores utilizados.....	61

3. ESTUDIOS <i>EX VIVO</i>	62
3.1 Estudios en macrófagos peritoneales de ratón	62
3.2 Estudios en aorta de ratón <i>ex vivo</i>	62
4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	62
4.1 Extracción de proteínas totales	63
4.2 Extracción de proteínas citoplásmicas y nucleares	63
4.3 Western Blot	63
5. ELISA	63
6. ANÁLISIS DE ARN	64
6.1 Extracción de ARN	64
6.2 PCR cuantitativa a tiempo real	64
7. INMUNOFLOURESCENCIA	65
7.1 Células en cultivo	65
7.2 Tejido	65
7.2.1 Detección de TLR4 en riñón	65
7.2.2 Detección de CD31/p65 y α -SMA/p65 en aorta	66
7.2.3 DHE en aorta	66
8. INMUNOHISTOQUÍMICA	67
9. TINCIONES HISTOLÓGICAS	70
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70
RESULTADOS	72
1. CARACTERIZACIÓN DE LA INFLAMACIÓN Y DE RESPUESTAS PATOGENICAS ASOCIADAS EN UN MODELO MURINO PROGRESIVO DE NEFROTOXICIDAD POR CICLOSPORINA A	74
1.1 La CsA induce inflamación renal progresiva	74
1.2 La CsA induce fibrosis posterior a la aparición de la inflamación	77
1.3 La CsA induce daño tubular en el riñón	78
2. PAPEL <i>IN VIVO</i> DE TLR4 EN LA NEFROTOXICIDAD MEDIADA POR CSA	80
2.1 La administración sistémica de CsA incrementa la expresión renal de TLR4	80
2.2 TLR4 es un mediador de la inflamación renal inducida por CsA	81
2.3 Las vías de señalización proinflamatorias activadas por CsA <i>in vivo</i> son dependientes de la actividad de TLR4	83

2.4 TLR4 participa como mediador de la fibrosis renal inducida por CsA.....	85
2.5 La inhibición de TLR4 atenúa el daño tubular y la pérdida de función renal producida por CsA.....	87
2.6 En células tubulares en cultivo y en el riñón <i>in vivo</i> , CsA moviliza HMGB1 de manera no dependiente de TLR4.....	88
3. PAPEL DE TLR4 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA ENDOTELIAL Y VASCULAR INDUCIDA POR CSA Y Tac.....	91
3.1 TLR4 actúa como mediador de la inflamación inducida por los ACNs en células endoteliales y vasculares <i>in vitro</i>	91
3.2 TLR4 actúa como mediador de la inflamación inducida por los ACNs en cultivos <i>ex vivo</i> de aortas de ratón.....	92
3.3 La inducción de inflamación por ACNs en aorta está ligada a la producción de ROS formados por activación de TLR4.....	94
4. PAPEL DE LA RESPUESTA UPR LIGADA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA REGULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR CSA Y Tac.....	96
4.1 Análisis transcriptómico de la respuesta UPR inducida por CsA y Tac en células tubulares murinas.....	96
4.2 Los inhibidores de calcineurina CsA y Tac activan NF-κB a través de la respuesta UPR..	97
4.3 Caracterización de la respuesta UPR <i>in vivo</i> en el modelo de nefrotoxicidad progresiva por Ciclosporina A.....	102
5. INHIBICIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE TLR4 CON QM56 EN MODELOS CELULARES Y ANIMALES DE SEPSIS RENAL.....	106
5.1 QM56 inhibe la inflamación renal en un modelo de daño agudo por LPS.....	106
5.2 QM56 inhibe respuestas proinflamatorias inducidas por LPS en tipos celulares relevantes en la patogenia de la sepsis renal.....	108
5.3 QM56 inhibe la activación de MAPKs y no impide la activación de NF-κB.....	110
5.4 QM56 inhibe respuestas inflamatorias dependientes de la activación de TLR2 por el ligando LTA.....	113
6. PAPEL DE LA QUIMIOQUINA CCL20 Y RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS ASOCIADAS EN LA INFLAMACIÓN RENAL POR ACNs.....	114
6.1 Análisis transcriptómico de la respuesta inflamatoria inducida por CsA y Tac en células tubulares murinas.....	114

6.2 Los ACNs promueven la expresión génica de CCL20 en los tipos celulares más relevantes de la inflamación.....	115
6.3 La CsA induce la expresión génica y síntesis proteica de CCL20 en el modelo murino progresivo de nefrotoxicidad.....	116
6.4 Bloqueo de CCL20 en el modelo de nefrotoxicidad por CsA.....	118
DISCUSIÓN.....	123
1. LA INFLAMACIÓN RENAL COMO MECANISMOS PROMOTOR DE LA NEFROTOXICIDAD POR ANTICALCINEURÍNICOS.....	125
2. PAPEL DE TLR4 COMO MEDIADOR INFLAMATORIO Y DE RESPUESTAS PATOGENICAS ASOCIADAS EN LA NEFROTOXICIDAD POR ACNs.....	127
3. PAPEL DE TLR4 COMO MEDIADOR INFLAMATORIO Y DE RESPUESTAS PATOGENICAS ASOCIADAS EN LA TOXICIDAD VASCULAR POR ACNs.....	131
4. ESTRÉS DE RETÍCULO Y UPR COMO RESPUESTAS ACCESORIAS A LA INFLAMACIÓN RENAL INDUCIDA POR ACNs.....	133
5. INTERVENCIÓN TERAPÉUTICA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TLR4.....	135
6. REGULACIÓN DE LA NEFROTOXICIDAD POR CCL20 Y REPUESTAS INMUNOLÓGICAS ASOCIADAS.....	138
CONCLUSIONES.....	142
BIBLIOGRAFÍA.....	146
ANEXO. A.....	161
ANEXO. B.....	165

Introducción

1. FISIOPATOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN RENAL

1.1 Generalidades

El sistema inmune se activa en contraposición al estrés celular con el fin de mantener la homeostasis y el normal funcionamiento de tejidos y órganos. De forma general, la respuesta inflamatoria requiere de la presencia de inductores o estímulos inflamatorios; sensores y transductores de la acción de los estímulos en el tejido diana; mediadores solubles y efectores inflamatorios, y finalmente, de mecanismos compensadores o reparadores que actúan de forma activa y altamente regulada con el fin de evitar una respuesta excesiva conducente a la progresión del daño (1,2). En el riñón, la respuesta inflamatoria se origina como un proceso regulador y compensador del daño, aunque también como iniciador del mismo, de modo que juega un papel protagonista en la patogenia tanto del daño renal agudo y crónico, como en la progresión entre estas dos condiciones patológicas (Figura 1).



Figura 1. Papel de la inflamación en la patología renal. Diversos factores actúan como estímulos nocivos en el riñón, los cuales afectan a la homeostasis y el normal funcionamiento del órgano. La inflamación, que actúa a modo de respuesta compensatoria, también ejerce un papel principal en la evolución del daño renal, contribuyendo de modo decisivo en procesos de daño agudo o crónico. Además, la inflamación dirige la progresión entre ambas condiciones patológicas.

De forma general, en procesos agudos determinados por isquemia, infecciones órgano-específicas, sepsis o nefrotoxicidad, la inflamación renal se inicia rápidamente por la respuesta del tejido frente a estímulos nocivos que inducen disfunción y/o pérdida de viabilidad de las células intrínsecas, principalmente endoteliales y tubulares, además de en podocitos y células mesangiales (3–6). En estos tipos celulares se disparan señales intracelulares proinflamatorias, principalmente a través de la activación de NF- κ B, que conducen a la síntesis de citoquinas y quimioquinas necesarias para el reclutamiento e interacción de células infiltrantes del sistema inmune innato y adaptativo, principalmente neutrófilos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos. En conjunto, estas respuestas

actúan de forma coordinada en procesos reparativos o, en caso de persistencia de las causas que las originan, pueden perpetuarse y ser determinantes en la progresión de la lesión renal hacia la cronicidad (7,8). En la enfermedad crónica (ERC), la inflamación puede acompañar de forma subyacente procesos metabólicos mal controlados (diabetes), genéticos (poliquistosis) y procesos autoinmunes con impacto renal (glomerulonefritis autoinmune). En estos casos, los mediadores inflamatorios pueden también desencadenar procesos de muerte celular e incluso actuar como factores profibrogénicos, provocando en ambos casos la pérdida del tejido funcional y su reemplazo por tejido de cicatrización, así como una retroalimentación positiva de la inflamación.

1.2 Principales tipos celulares renales involucrados en la inflamación

Los **túbulos renales** forman la estructura primordial de la nefrona, unidad funcional del riñón donde se modifica el contenido del ultrafiltrado glomerular mediante procesos de reabsorción de sustancias útiles para el organismo, y de filtración y secreción de metabolitos de desecho y sustancias nocivas que se excretan mediante la orina. El epitelio tubular renal es susceptible de sufrir lesiones debido a estímulos dañinos, resultado de procesos isquémicos, sepsis, agentes nefrotóxicos, enfermedades metabólicas o genéticas y procesos autoinmunes que causan inflamación, disfunción tubular, muerte celular y pérdida de función renal (9). A pesar de ello, las células tubulares tienen una alta capacidad regenerativa resultante de mecanismos endógenos de reparación y generación de nuevos túbulos (10). No obstante, la exposición prolongada al estímulo nocivo genera una respuesta inflamatoria exacerbada que promueve procesos fibrogénicos, genera atrofia tubular y, en consecuencia, una pérdida paulatina de función renal, característica principal de la ERC y en última instancia, contribuye al establecimiento de la enfermedad renal terminal (ERT). El epitelio tubular tiene una alta capacidad de sintetizar citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que actúan sobre el mismo epitelio, o sobre otras estructuras y células intrínsecas del riñón, y que promueven la activación y movilización de células del sistema inmune innato y adaptativo. Entre los múltiples mecanismos que disparan la síntesis de estos mediadores proinflamatorios en las células tubulares se encuentran involucrados la activación de receptores del sistema inmune innato y por la acción de moléculas coestimuladoras expresadas en la superficie celular que interaccionan y regulan la actividad de linfocitos T. Estas funciones accesorias del epitelio tubular convierten a este tipo celular en un elemento central en la regulación de la respuesta inflamatoria renal (6).

El **endotelio vascular** regula numerosos procesos fisiológicos, entre los que destacan el control del tono vascular, el tráfico de células y nutrientes, la permeabilidad vascular y respuestas hemostáticas e inflamatorias (11). La fisiopatología del fracaso renal agudo (FRA) se caracteriza por la interrelación establecida entre los túbulos y endotelios, especialmente a nivel microvascular, siendo la inflamación un fenómeno común inducido en ambos tipos celulares. En el FRA y en la ERC, el endotelio se activa por acción de sustancias vasoactivas provenientes de las células intrínsecas sometidas a estrés. En consecuencia, se produce un incremento de la expresión de moléculas de adhesión (integrinas como ICAM-1 o VCAM-1 y selectinas) que permiten la unión y extravasación de leucocitos circulantes hacia focos inflamatorios en el riñón en respuesta a quimioquinas secretadas por las células tubulares. Además, el propio endotelio también es capaz de producir numerosas citoquinas que actúan sobre los leucocitos circulantes, así como otras moléculas involucradas en la inflamación (tromboxanos, prostaglandinas, leucotrienos y óxido nítrico) (6). Cuando la inflamación no resuelve la progresión del daño, las células endoteliales disminuyen su número y pierden su funcionalidad, dando lugar a disfunciones vasculares que incluyen pérdida del tono vascular, aumentos en la perfusión y la permeabilidad, menor adhesión y el transporte de células a través de la pared vascular (7). La inflamación juega también un papel predominante en la enfermedad vascular asociada a la ERC. En procesos crónicos como la nefropatía diabética, la lesión glomerular es acompañada por la liberación de mediadores proinflamatorios como IL-6, TNF- α y TGF- β por las células endoteliales y por los podocitos. Estos factores inducen la movilización de células del sistema inmune al glomérulo, aunque también actúan sobre los túbulos renales, los cuales amplifican la respuesta inflamatoria, pudiendo contribuir al establecimiento de la fibrosis (12). También resulta muy destacable la participación de algunas citoquinas con un papel relevante en la inflamación como TWEAK y CXCL16 en la generación de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica en pacientes con ERC (13,14). Por otra parte, una de las complicaciones más frecuentes en el trasplante renal se debe al efecto nefrotóxico de los inhibidores de calcineurina o anticalcineurínicos (ACNs) sobre la vasculatura renal. Los ACNs inducen daño en las células endoteliales y vasculares lo que resulta en el incremento de la expresión de factores relacionados con la inflamación como moléculas vasoconstrictoras (endotelina o tromboxanos), así como una reducción en la producción de factores vasodilatadores (prostaciclina, prostaglandinas y óxido nítrico). Este proceso aumenta la resistencia vascular y disminuye el flujo sanguíneo en el riñón, lo que desencadena una afectación tubular y de forma secundaria una disminución de la función renal (15,16).

1.3 Inmunidad innata y adaptativa

El sistema inmunitario general comprende dos ramas principales, la respuesta inmune innata y la adaptativa, ambas importantes en la génesis y el desarrollo de la patología renal. El componente innato de la inmunidad es el responsable de la respuesta inicial a un daño no específico o a ciertos antígenos de patógenos, y compromete la participación de diferentes mediadores solubles (citoquinas, quimioquinas) y tipos celulares como neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células natural killer (NK). Como se puntualizó en el apartado 1.2, el epitelio renal y endotelio vascular, así como otras células intrínsecas del riñón, participan en la respuesta inmune innata como células inmunológicas no profesionales. Por otra parte, el componente adaptativo o adquirido de la respuesta inmune se activa por antígenos específicos y está mantenido por mecanismos innatos activados previamente. Este proceso incluye maduración de células dendríticas tras la presentación antigénica, proliferación y activación de linfocitos T e interacción entre linfocitos T maduros y linfocitos B (6). Las respuestas innatas y adaptativas son interdependientes y dinámicas, por lo que el inicio, mantenimiento y eventual cese del proceso inflamatorio global es ampliamente dependiente y regulado por ambas respuestas.

1.3.1 Receptores celulares

En la enfermedad renal, las células tubulares, vasculares y macrófagos incrementan la expresión de receptores de la inmunidad innata tipo Toll (TLR). Estos son receptores de membrana evolutivamente muy conservados que interaccionan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como productos de ácidos nucleicos, lipoproteínas y carbohidratos microbianos, o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) intracelulares como nucleótidos de doble cadena, o que son liberados por las células dañadas, como HMGB1, proteínas de shock térmico (HSPs), ácidos nucleicos, hialuronanos y biglicanos, entre otros. Los receptores TLRs se activan y oligomerizan para formar complejos de señalización, desencadenando cascadas de activación de señales que resultan en la síntesis y la secreción de factores proinflamatorios contribuyen decisivamente en el proceso inflamatorio (6,17–20). Estructuralmente, los TLRs presentan un dominio extracelular de reconocimiento de ligando rico en leucinas (LRR) y un dominio intracelular tipo Toll/IL-1R (TIR) donde se unen moléculas adaptadoras. Existen dos clases de TLRs, los ubicados en la membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12 y TLR13) y los que presentan una localización intracelular expresándose en membranas endosomales (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) (17,21).

La activación de la mayoría de los TLRs involucra la participación de moléculas adaptadoras como MyD88 y TRIF, que acoplan la señal extracelular con proteínas quinasas que transducen esta señal intracelularmente. Por su parte, el receptor TLR3 solo señala a través de la adaptación por TRIF. El adaptador Myd88 en conjunción con TIRAP/Mal, forman el núcleo de los complejos proximales al receptor que actúan como plataformas de activación de señales intracelulares iniciales (IRAK, TRAF6), resultando en la activación de señales intermedias (TAK, MAPKs) y efectoras (NF- κ B, AP-1) necesarias para la síntesis de citoquinas y factores proinflamatorios (17,22) **(Figura 2)**. Por su parte, la señalización a través de complejos proximales formados por el adaptador TRIF, activa factores de transcripción de la familia de los reguladores de interferón (IRF3, IRF7) que a su vez regulan la expresión génica de Interferones tipo I (IFN- α , INF- β) (21) **(Figura 2)**. Los TLRs y vías de señalización acopladas por estos receptores están implicados en diversas enfermedades renales, incluyendo daño agudo por isquemia y nefrotoxicidad, rechazo agudo del trasplante o nefritis autoinmunes entre otras, donde participan como inductores de la inflamación y del daño tubular temprano, así como en la patogénesis de la fibrosis renal asociada a la nefropatía diabética (22). Se ha observado que durante el FRA, las células del túbulo renal así como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, aumentan de forma significativa la expresión de los receptores TLR2 y TLR4, los cuales están implicados en la generación del daño renal (6,8,23,24). En la nefropatía diabética, la activación de TLR4 promueve inflamación, daño podocitario y fibrosis intersticial (25), mientras que en el FRA originado por I/R, TLR4 induce daño endotelial temprano (24). Además, en modelos animales de trasplante y en biopsias de pacientes con disfunción crónica del injerto, el aumento de expresión tubular de TLR4 y TLR2 se ha relacionado con un proceso inflamatorio sostenido conducente a fibrosis renal (26).

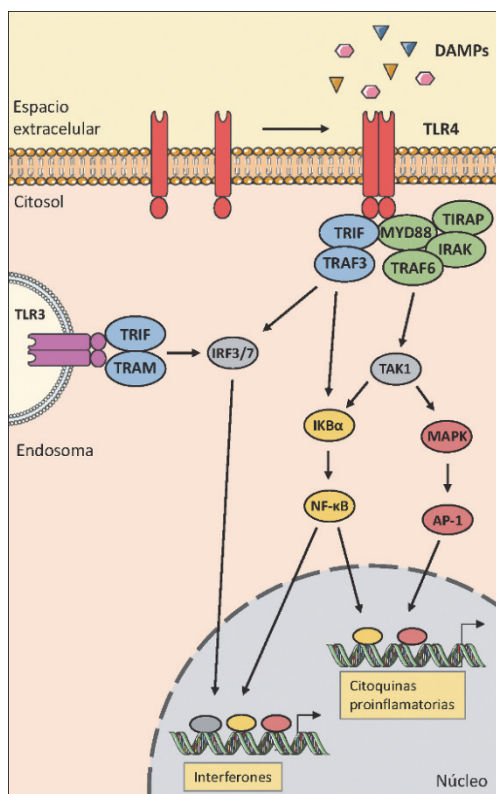


Figura 2. Esquema general de las principales vías de señalización de TLRs implicadas en la inflamación renal. En respuesta a un daño, las células tubulares dañadas liberan ligandos endógenos (DAMPs) capaces de activar receptores TLR que se ubican en la membrana extracelular como TLR4. En respuesta a su activación, TLR4 homodimeriza y forma complejos proteicos con MyD88 y TRIF que transducen la señal hacia proteínas kinasas (MAPK, I κ B- α), que activan la transcripción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias a través de la acción de factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B. Además, receptores intracelulares como TLR3 activados por DAMPs intracelulares, señalizan exclusivamente a través de TRIF, y reclutan los factores de transcripción IRF3/7, que, junto a NF- κ B y AP-1, forman un complejo regulador de la expresión de genes relacionados con interferones (INFs).

1.3.2 Mediadores solubles (citoquinas y quimioquinas) y moléculas de adhesión

En respuesta al daño renal inducido en procesos de isquemia, sepsis, agentes nefrotóxicos o proteinuria, las células endoteliales y epiteliales de túbulo producen numerosas citoquinas proinflamatorias que estimulan la síntesis de quimioquinas (8,27,28). Como se citó anteriormente, las células epiteliales de túbulo renal son consideradas el principal tipo celular capaz de producir un gran número de citoquinas en respuesta a factores inmunes y no inmunes (18,29). Otra importante fuente de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias son las células dendríticas, que a través de estos factores establecen múltiples relaciones entre células de la inmunidad innata y adquirida (30). Las quimioquinas son un extenso grupo de citoquinas quimiotácticas que promueven el reclutamiento de leucocitos en el proceso inflamatorio (7,8,27). Además de la capacidad para dirigir la migración de células inmunológicas al foco inflamatorio, las quimioquinas participan en procesos de proliferación y diferenciación de leucocitos en diferentes fenotipos específicos de órgano, así como en el mantenimiento del proceso inflamatorio y en la inducción de la fibrosis. Se ha descrito que la quimioquina IP-10 producida por macrófagos participa en la regeneración de las células tubulares, además de inducir la proliferación de células mesangiales.

También, CCL5/Rantes actúa como molécula coestimuladora de la proliferación de células T. Asimismo, numerosas quimioquinas secretadas por las células tubulares, estimulan la síntesis de factores de crecimiento, esenciales para activar mecanismos de regeneración. (27,31).

Las quimioquinas se dividen en 4 subfamilias (CXC, CC, C y CX3C) acorde al número y disposición de los residuos de cisteína en sus secuencias. La síntesis de quimioquinas puede ser inducida por citoquinas, activación del complemento, especies reactivas de oxígeno (ROS), señalización por NF- κ B, y por vías dependientes de receptores TLR. Las citoquinas e interleuquinas regulan múltiples respuestas leucocitarias. Entre las más expresadas en el riñón se encuentran IL-2, INF γ (actúan sobre linfocitos Th1 y NK), IL-4, IL-5, IL-13 (actúan sobre linfocitos Th2 y eosinófilos), IL1- β , TNF- α , TWEAK, IL-6, TGF β (actúan sobre monocitos y macrófagos), IL-10, IL-17 (actúan sobre linfocitos Treg y Th17) (7,8,30).

En modelos experimentales de daño renal, se ha demostrado la participación de citoquinas y quimioquinas específicas como mediadores del daño (7,27). Las quimioquinas tipo CXC como CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, CXCL3, y CXCL10/IP-10 están aumentadas en las células tubulares durante el FRA experimental, correlacionándose con un aumento en el infiltrado tisular de neutrófilos. Además, la mayor expresión de quimioquinas del subgrupo CC como CCL2/MCP-1 y CCL5/RANTES se correlaciona con una marcada infiltración de monocitos y macrófagos. Por otro lado, un aumento en la expresión de CX3C promueve la infiltración de linfocitos Th1. Las células endoteliales expresan la quimioquina CX3CL/Fractalkina, facilitando la migración de macrófagos (3,6).

Existen numerosos estudios que evidencian cambios en la expresión de quimioquinas del subgrupo CXCL hacia quimioquinas tipo CCL en la transición de la inflamación aguda a la inflamación renal crónica (30). Diversas patologías renales crónicas como la nefropatía diabética, glomerulonefritis o glomeruloesclerosis cursan con proteinuria. La presencia de grandes cantidades de proteínas en la orina induce la síntesis y secreción de quimioquinas y de sus receptores en las células tubulares. De este modo, incrementos de CCL2/MCP-1 y de su receptor CCR2 así como de CCL5/Rantes y de sus receptores CCR1, CCR3 y CCR5 se asocian con un aumento en la infiltración renal de macrófagos y linfocitos T respectivamente. Además, también se han observado que la proteinuria promueve aumentos de CCL20, CXCL8, CXCL10/IP-10 y CXCL16 y una consecuente mayor presencia de células T y B, neutrófilos, eosinófilos y monocitos (32).

Con perspectiva de aplicación en la clínica, se están desarrollando estrategias experimentales de prevención de la respuesta inflamatoria a través de la supresión génica o inhibición farmacológica (neutralizantes de ligandos, antagonistas de receptores, anticuerpos bloqueantes) de quimioquinas y de sus receptores. Así, el bloqueo de CXCL1, CXCR2 y CCR2 reduce la infiltración de neutrófilos y macrófagos, inhibe la necrosis tubular y previene el deterioro de la función renal tras la isquemia/reperfusión (I/R) (7,27,30).

También se ha observado que, en modelos experimentales de nefropatía por proteinuria (nefropatía diabética, glomerulonefritis), el bloqueo con anticuerpos neutralizantes de CCL2, CXCL18 o CXCL16, o el uso de antagonistas de los receptores CCR2 o CCR5, reducen el infiltrado renal de leucocitos y disminuyen la inflamación y la proteinuria (32,33). De manera destacable, el antagonismo farmacológico de los receptores CCR2/CCR5 en un ensayo clínico en pacientes con nefropatía diabética disminuyó la excreción de albúmina y creatinina urinaria en pacientes con nefropatía diabética (177). En las distintas etapas del proceso inflamatorio se requiere la activación de las células endoteliales, fenómeno que implica una incrementada expresión de moléculas de adhesión. El bloqueo funcional o de la expresión de moléculas de adhesión se utilizó como estrategia para el tratamiento del FRA experimental. Así, se demostró que la administración de anticuerpos monoclonales anti ICAM-1 así como ratones deficientes en la proteína (ICAM-1^{-/-}) inducen protección frente al FRA isquémico (7). Además, el empleo del péptido B β (15-42) bloqueante de la unión de los leucocitos a la VE-cadherina, atenúo la inflamación en el daño por I/R en modelos murinos de trasplante renal alogénico (34).

1.3.3 Mediadores celulares

Neutrófilos. Los neutrófilos son importantes células efectoras del sistema inmune innato con activa participación en la enfermedad renal. Diversos estudios en FRA isquémico relacionan la depleción de neutrófilos, el bloqueo de su activación o la inhibición de su infiltración con un restablecimiento de la función renal. Como ejemplo, el empleo de un anticuerpo bloqueante de ICAM-1 en un modelo de isquemia renal, impidió esencialmente la migración de neutrófilos (35). Además, la depleción de neutrófilos circulantes con suero antineutrófilos o la utilización de ratones CD44^{-/-} preservan la función renal frente al FRA (7,8). En cambio, en modelos de FRA por cisplatino, la depleción de neutrófilos no previno el daño tubular (8). En la patología renal crónica, un incremento del infiltrado renal de neutrófilos promueve el daño glomerular en la nefritis lúpica (36). Además, en enfermedades que cursan con glomerulonefritis progresiva (síndrome de Goodpasture), los neutrófilos liberan moléculas prooxidantes y proteasas que aumentan la inflamación y el daño (36).

Macrófagos. Los macrófagos son células derivadas de monocitos sanguíneos que participan en la homeostasis, vigilancia, respuesta inmune, daño y reparación tisular. En el riñón, los macrófagos efectores del fenotipo proinflamatorio M1 median la respuesta inmune asociada al daño, actuando como células efectoras o presentadoras de antígeno, conectando la respuesta inmune innata y la adaptativa. Además, existen macrófagos reguladores M2 o antiinflamatorios, que limitan la inflamación y participan en procesos de reparación (8,24). Los monocitos se infiltran en el riñón dañado tras los neutrófilos, diferenciándose en macrófagos y contribuyendo a la inflamación y al daño tubular temprano (37). Tanto el FRA como la ERC se asocian con un aumento del número de macrófagos en el riñón (36). *In situ*, los macrófagos incrementan su capacidad fagocítica, la producción ROS y la síntesis de citoquinas proinflamatorias, principalmente IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α (3,8,37). Además, los macrófagos producen metaloproteasas (MMP), lo que les permite migrar a través de membranas basales y de la matriz tubulointersticial (37). Estudios recientes señalan que ratones deficientes en el receptor CCR2, así como la depleción de monocitos macrófagos con liposomas conteniendo clodronato, reduce el daño renal por isquemia y favorece la reparación tisular (37). Además, la inactivación de macrófagos mediante la inhibición funcional de TNF- α se correlacionó con la recuperación de la función renal en un modelo murino de nefrotoxicidad por cisplatino (37). En modelos murinos de ERC experimental como nefritis lúpica, glomerulonefritis por anticuerpos antimembrana basal glomerular o en nefropatía por adriamicina, la depleción de macrófagos también mejoró la función renal y atenuó el daño tubular y glomerular (37).

Células dendríticas. Las células dendríticas (DCs) junto a los macrófagos forman la primera línea de defensa del sistema inmune innato debido a su capacidad fagocítica, pero también son efectores y reguladores de la respuesta adaptativa mediante la presentación de antígenos a las células T (7,8,38). El número de DCs renales está sensiblemente incrementados en la isquemia renal. Este elevado tránsito celular hacia el foco inflamatorio está favorecido por un incremento de las interacciones de las propias DCs con las células endoteliales. En las glomerulonefritis, las DCs activan la respuesta de linfocitos T y por lo tanto contribuyen a la severidad del daño renal. Además, la infiltración de DCs en el trasplante renal se asocia con fibrosis intersticial y atrofia tubular. Sin embargo, la participación de DCs en el proceso fibrótico podría ser secundaria a la inflamación, ya que en modelos de obstrucción unilateral del uréter (UUO), la depleción de estas células no impide la fibrosis (39). Se han estudiado modelos de depleción de DCs y macrófagos residentes en el riñón con clodronato encapsulado en liposomas previo al daño por isquemia, obteniéndose una reducción significativa de la inflamación (7,40).

En cambio, modelos de FRA por cisplatino revelaron un empeoramiento en la función renal, mayor daño tubular, mayor infiltrado de neutrófilos e incluso mayor mortalidad en los ratones deplecionados de DCs comparados con los ratones no deplecionados (8). Estos resultados muestran una amplia funcionalidad de las DCs tanto favoreciendo como controlando el proceso inflamatorio.

Linfocitos. La activación del linfocito inmaduro mediante la presentación antigénica deriva en la diferenciación y expansión clonal de diferentes linajes, entre ellos los LT-CD4⁺cooperadores activados por la presentación antigénica dependiente de MHC-II y los LT-CD8⁺ citotóxicos dependientes de MHC-I. La producción de IL-2 por los LT-CD4⁺ activados resulta fundamental para diferenciarse hacia un perfil de células Th1 productoras de IFN- γ que activan macrófagos y células dendríticas, o hacia un fenotipo de células Th2 productoras de IL-4 que activan la respuesta inmune humoral dependiente de linfocitos B. Mientras que los linfocitos Th1 se relacionan con un fenotipo patogénico, los Th2 exhiben un fenotipo protector (3,8). La IL-2 es también fundamental para la diferenciación de los LT-CD4⁺ hacia células Th17 (productoras de IL-17) efectoras y para la generación, supervivencia y funcionalidad de células T reguladoras (Treg). Por último, la IL-2 es necesaria para la homeostasis de los LT-CD8⁺. Los linfocitos son importantes moduladores de la respuesta inflamatoria innata y adaptativa en modelos de FRA, participando en las fases tempranas y tardías del daño. Ratones nu/nu deficientes en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ exhiben protección frente al daño renal por isquemia, mientras que la transferencia de células CD4⁺ en estos ratones restaura el daño renal. Asimismo, la transferencia adoptiva de células CD4⁺ restablece la susceptibilidad frente al daño renal isquémico en ratones RAG1^{-/-} (deficientes en LT y LB), y μ MT (deficientes en LB), que normalmente están protegidos frente al mismo (3,7,8). Los LT-CD4⁺ son importantes mediadores de la nefrotoxicidad por cisplatino ya que ratones deficientes en linfocitos T CD4 y/o CD8 tratados con cisplatino, presentan mejor función renal y tasa de supervivencia que los ratones wild-type (8). La participación de la respuesta Th17 promoviendo el daño renal está bien establecida en modelos de glomerulonefritis autoinmune (41,42). Las células T reguladoras (Treg) son un subtipo de linfocitos con propiedades antiinflamatorias y reparadoras. Así, la depleción de Tregs con anticuerpos monoclonales anti-CD25 o ratones deficientes en FOXP3, factor de transcripción característico de células Treg activadas, produjo un aumento de la inflamación, necrosis tubular y pérdida de función renal tras el daño isquémico (8,43). Por el contrario, la transferencia adoptiva de células Treg procedentes de ratones wild-type previno el daño y disfunción renal de origen isquémico y nefrotóxico, y mejoró la supervivencia en estos mismos animales (8,43). Además, un papel nefroprotector de la respuesta Treg ha sido establecido en la glomerulonefritis experimental (44). En su conjunto, resultados de diversas investigaciones destacan a las células Tregs como nueva diana terapéutica del daño renal.

1.4 Relación de la inflamación con otros procesos patológicos

1.4.1 Inflamación y lesión tubulointersticial y glomerular

Las principales alteraciones encontradas en el túbulo renal postrior al FRA se deben a la pérdida de celularidad, desprendimiento de células que aparecen en el lumen tubular, desaparición del borde en cepillo y formación de depósitos hialinos en la luz del túbulo. Mientras que en el FRA isquémico o por cisplatino se produce una necrosis tubular aguda, en la nefrotoxicidad por CsA los túbulos se ven afectados por dilatación tubular, vacuolización citoplásmica, hialinosis y picnosis (16,45). De forma global, estas lesiones afectan la función renal, produciendo una disminución de la tasa de filtrado glomerular (GFR) y un aumento recíproco de los niveles de urea y creatinina sérica. La inflamación está intrínsecamente relacionada con estas lesiones ya que la inactivación de mecanismos proinflamatorios en modelos experimentales de FRA (vías de señalización dependientes de receptores TLR, DAMPs, MAPKs) resulta en una mejoría de las mismas (3,26,46,47). Cabe destacar que las respuestas proinflamatorias generadas en los túbulos, también repercute en las lesiones glomerulares de las glomerulonefritis autoinmunes o glomeruloesclerosis, en particular de la nefropatía diabética (28).

Una de las respuestas iniciales del túbulo frente a un daño se basa en un aumento de la síntesis de los biomarcadores KIM-1 y NGAL/LCN2 en los túbulos proximales y distales, respectivamente. Modelos experimentales demuestran que KIM-1 juega un papel importante en la inflamación mediante la regulación de la respuesta de las células del infiltrado inflamatorio en el área tubulointersticial. Además, en biopsias renales humanas, se han observado aumentos de expresión de KIM-1 en áreas de daño tubulointersticial, caracterizado por la presencia de células T y macrófagos (48). Las células tubulares del riñón sintetizan y liberan NGAL rápidamente en respuesta a diferentes tipos de daño tubular, con la consecuente activación de mecanismos de división y diferenciación de las células renales (49). Además, la inducción de NGAL por las células tubulares también es consecuencia de su interacción con las células inflamatorias, principalmente neutrófilos, por lo que también participa en etapas iniciales del proceso inflamatorio renal (50). Una respuesta inflamatoria exacerbada también se relaciona con fenómenos de muerte celular. La muerte de las células tubulares es un factor patogénico especialmente reconocido como desencadenante del FRA. Por otra parte, la atrofia tubular es característica del proceso fibrótico iniciado con la lesión tubular, o secundario a enfermedades de origen glomerular como la nefropatía diabética y la enfermedad glomerular autoinmune.

En términos generales, la muerte de las células renales se puede englobar en dos procesos diferenciados y con distinto nivel de regulación como son la apoptosis y la necrosis.

La pérdida de células tubulares renales por apoptosis es un proceso característico del FRA y de la ERC. Los túbulos renales sometidos a estrés o daño, expresan multitud de mediadores inflamatorios entre los que se identifican miembros de la superfamilia de los TNFs e INFs, los cuales regulan respuestas inmunes y homeostáticas. Además, algunas de estas moléculas como FasL, TRAIL, TNF- α , INF γ y TWEAK inducen apoptosis por sí mismos o actuando en conjunto (51). Por ejemplo, TWEAK induce apoptosis de células tubulares tratadas en combinación con TNF- α e INF γ , y su bloqueo funcional en modelos experimentales de FRA y ERC, disminuye la muerte de células tubulares (51,52). Por otra parte, formas de necrosis regulada, como la necroptosis y ferroptosis también ocurren en el transcurso de la patogenia del FRA nefrotóxico (53,54). A diferencia de la apoptosis, la necrosis regulada es un proceso más inmunogénico ya que la pérdida de la integridad de la membrana plasmática celular permite la liberación de DAMPs que estimulan y amplifican la respuesta inflamatoria. Además, procesos de muerte celular por piroptosis o necroptosis inducen la producción de citoquinas proinflamatorias (55).

1.4.2 Inflamación y fibrosis

La desregulación o la ausencia de resolución del proceso inflamatorio conduce a un aumento exacerbado de la infiltración de leucocitos en el riñón, principalmente macrófagos, células dendríticas y células T, que, en estrecha interrelación con las células intrínsecas del riñón, incrementan la producción de numerosos factores profibróticos, entre los que destaca fundamentalmente el TGF- β , reconocido como un mediador clave de la fibrosis. Estos factores activan fibroblastos intersticiales, principales responsables de la síntesis de colágenos, fibronectina y proteoglicanos, componentes primordiales de la matriz extracelular y cuya excesiva producción conduce al reemplazo del tejido normal por tejido de cicatrización y a la fibrosis tubulointersticial y glomerular (10,56). En la evolución del proceso fibrótico, los fibroblastos activados expresan la proteína α -actina (α -SMA) y adquieren un fenotipo contráctil, denominándose miofibroblastos. Funcionalmente, además de producir matriz extracelular, los fibroblastos sintetizan citoquinas y quimioquinas que generan o retroalimentan la respuesta inflamatoria (57). Aparte de originarse a partir de fibroblastos residentes, un porcentaje menor pero significativo de los miofibroblastos derivan de pericitos mesenquimales y de las células endoteliales y tubulares mediante un proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) (57). Factores solubles de la inflamación como MCP-1, Rantes y TWEAK son importantes mediadores de la TEM y la fibrosis (51,58,59).

También, factores primeramente descritos como profibróticos, como el CTGF, se han relacionado recientemente con actividad proinflamatoria (60,61). Receptores de la inmunidad innata como TLR4, también participa en la fibrogénesis renal, ya que la inhibición de la señalización de este receptor resultó en disminución de la fibrosis en modelos de nefritis tubulointersticial y enfermedad renal progresiva (62,63).

El mayor mediador del proceso fibrótico en el riñón es la citoquina TGF- β , principal producto inflamatorio producido principalmente por los macrófagos infiltrantes y el tejido renal que activan los fibroblastos residentes para la producción de proteínas de matriz extracelular. Además de su papel profibrótico, TGF- β también puede exhibir funcionalidades antiinflamatorias y protectoras. Numerosos estudios *in vitro*, así como modelos animales fibrogénicos como el UUO demuestran que la intervención de TGF- β resulta en una disminución de los depósitos de matriz. A pesar de ello, en ensayos preclínicos focalizados en la intervención de TGF- β , el grado de inhibición de la fibrosis renal y la progresión hacia la ERC no resultaron completamente satisfactorios. Estos resultados sugieren la participación de TGF- β en procesos protectores y de reparación (64). Diferentes estudios preclínicos han evaluado potenciales dianas alternativas para la terapia antifibrótica, como la inhibición de rutas de señalización inducidas por TNF- α , IL-1 β y TWEAK (52,65). La resolución de la inflamación y la regeneración son procesos clave para la restauración de la homeostasis tisular tras la generación de un daño y para evitar la deriva del proceso hacia la fibrosis. Entre estas respuestas adaptativas, la reducción en los DAMPs y PAMPs, así como un incremento en la apoptosis celular puede representar un cambio en el microambiente renal que conduce a la generación de macrófagos del fenotipo M2, los cuales secretan factores antiinflamatorios como IL-10 o TGF- β (37). Otras células que contribuyen a la resolución de la inflamación son las Tregs, mediante la secreción de factores supresores de la activación de células de la inmunidad innata y adaptativa. Otros factores que participan en la resolución de la inflamación son inhibidores de citoquinas y factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, proteínas reguladoras del complemento o activación de receptores “scavenger” (2). Por el contrario, el fracaso de los mecanismos de resolución y la persistencia del daño, puede inducir una parada del ciclo celular en la fase G2/M en las células epiteliales del túbulo renal, lo cual activa la señalización de JNK y la posterior inducción de mediadores profibróticos, para generar fibrosis tubulointersticial (66,67).

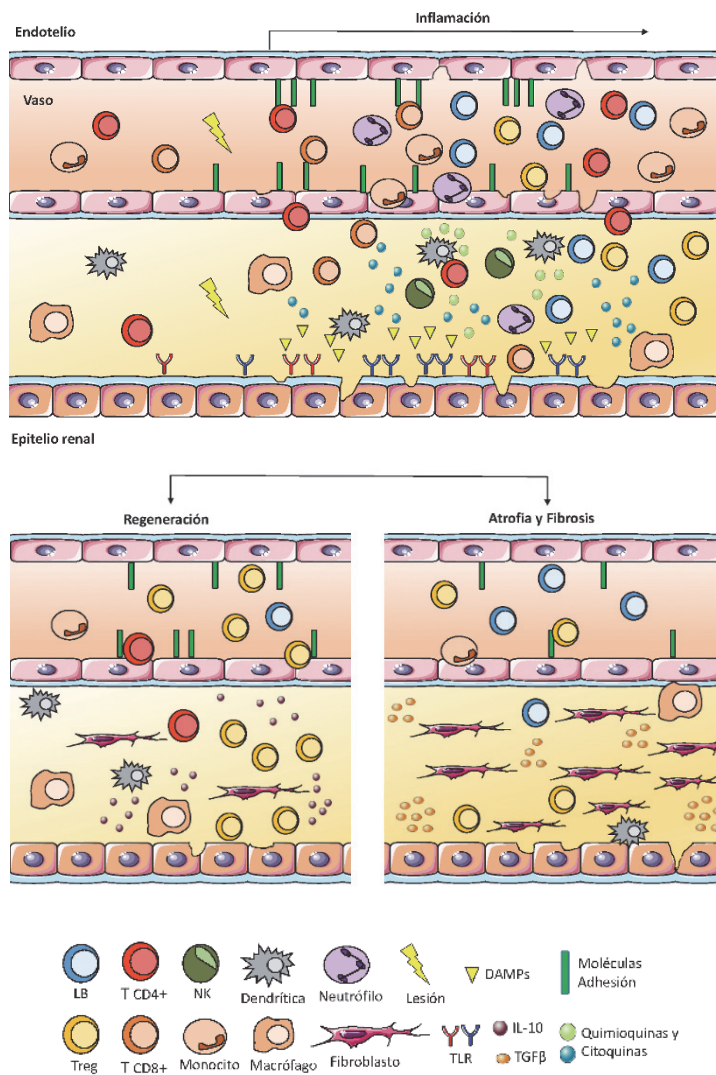


Figura 3. Proceso inflamatorio, regeneración, atrofia y fibrosis durante el daño renal. La lesión renal iniciada por múltiples factores induce la producción de diversos factores proinflamatorios (citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión) en las células tubulares y endoteliales y en las propias células leucocitarias movilizadas hacia el foco inflamatorio. Factores adicionales como los DAMPs interaccionan con receptores TLR expresados en los epitelios y células inmunes retroalimentando la síntesis de factores proinflamatorios **(A)**. La inflamación es un contribuyente principal del daño estructural del riñón controlado por mecanismos adaptativos de reparación que se activan tanto en las células intrínsecas como en células infiltrantes (macrófagos M2, células dendríticas, fibroblastos, Tregs). La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria clave en la etapa regenerativa **(B)**. En ausencia de una regeneración efectiva, el microambiente celular inflamatorio modifica la funcionalidad de fibroblastos para la producción de factores profibróticos (TGFβ) e inhibe la respuesta de Tregs **(C)**.

1.5. Mecanismos proinflamatorios accesorios

1.5.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo supone un mecanismo principal de defensa celular que se inicia por la generación de agentes pro-oxidantes y de ROS, principalmente de origen mitocondrial. Un desequilibrio en esta respuesta con excesiva producción y acumulación de ROS es capaz de oxidar y modificar biomoléculas incluyendo ADN, lípidos y proteínas. Debido a que el riñón es rico en mitocondrias, la generación de estrés oxidativo resulta en uno de los procesos patogénicos más críticos implicados en el inicio, desarrollo y progresión de la mayoría de las patologías renales, principalmente del FRA (68,69). Estudios recientes en modelos de sepsis e I/R, evidencian que el estrés oxidativo juega un papel principal en el desarrollo y perpetuación de la inflamación renal, ya que la generación de factores oxidantes activa directamente células endoteliales de la microvasculatura y células del epitelio tubular, generando DAMPs e inflamación (70,71). Diversas investigaciones estudian el desarrollo de nuevos fármacos y péptidos sintéticos que disminuyen el estrés oxidativo y mejoran la inflamación en FRA, como por ejemplo el ácido siálico, fluoxetino y luteína que reducen el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis en riñones de ratas en modelos de daño renal séptico o isquémico (72). Además, importantes investigaciones han definido que el estrés oxidativo es uno de los factores más importantes que contribuyen al daño endotelial y epitelial del riñón por agentes nefrotóxicos como el fármaco inmunosupresor CsA. La CsA contribuye a la potenciación del daño renal por estrés oxidativo mediante la activación de la vía de JAK2. La inhibición de esta ruta mediante el fármaco AG490 evidencia una protección frente al daño tubular y endotelial en el riñón (73).

1.5.2 Estrés de retículo endoplásmico y respuestas relacionadas

En células eucariotas, la mayoría de las proteínas se sintetizan, ensamblan y maduran en el lumen del retículo endoplásmico (RE), el cual también ejerce el control homeostático de estos procesos. La excesiva carga proteica y el flujo aumentado de proteínas defectuosas o mal plegadas en situaciones que afectan al normal funcionamiento celular, desencadena estrés del RE (74,75). La Unfolding Protein Response (UPR) es un conjunto de mecanismos fisiológicos de reparación de proteínas defectuosas que favorecen su degradación mediante un mecanismo conocido como ERAD, o bien incrementan la eficiencia de su plegamiento. Además, se conoce que la UPR puede activar distintos procesos celulares como la apoptosis, la autofagia y la inflamación con fines reparativos (74,76,77). El funcionamiento de la UPR compromete la participación de tres vías de señalización, iniciadas por las proteínas-quinasas IRE1 (Inositol-Requiring protein 1) y PERK (RNA PKR-like ER kinase), y por el factor de transcripción ATF6 (Activating Transcription Factor 6) (75). IRE1 es una proteína transmembrana que dimeriza y se autofosforila para activarse en presencia de proteínas mal plegadas. La activación de la isoforma IRE1 α promueve el splicing del gen del factor de transcripción XBP1 (ARNm de la X-box bindingprotein 1) y la posterior codificación de la proteína XBP1s necesaria para la síntesis de genes implicados en la respuesta UPR y ERAD. PERK también es una proteína transmembrana que oligomeriza, se autofosforila y fosforila al factor iniciador eucariótico eIF2 α para inhibir la traducción de proteínas, contribuyendo de este modo a reducir la excesiva carga proteica en el RE producida en condiciones de estrés celular. Además, eIF2 α promueve la traducción de factores de transcripción implicados tanto en la síntesis de genes diana de la UPR, como ATF4 (activating transcription factor 4), así como en la inhibición de la traducción de proteínas y en la activación de procesos de muerte celular, como CHOP (C/EBP homolog protein). Por su parte, la activación y translocación nuclear de ATF6 también contribuye a la activación de genes de UPR y ERAD. Bajo condiciones de estrés celular, las tres ramas de la UPR se activan de forma rápida e independiente. A pesar de ello, numerosos estudios ponen de manifiesto la importancia de la interacción entre estas vías, siendo uno de los ejemplos más representativos la participación de ATF6 como inductor de la transcripción de XBP-1 (75,78–80) (Figura 4).

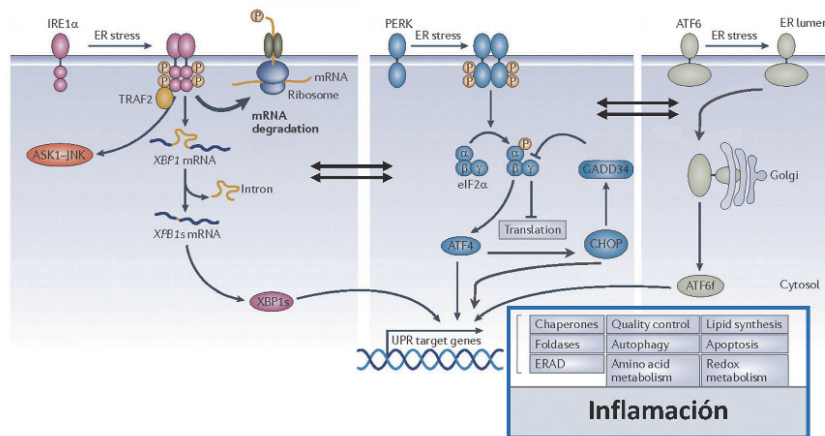


Figura 4. Vías principales de la UPR. El estrés del RE desencadena una serie de respuestas adaptativas conocidas en su conjunto como UPR, iniciada a través de la activación de cascadas de señalización dependientes de IRE1α (A), PERK (B) y ATF6 (C). Los factores de transcripción efectores de estas vías de señalización (XBP1, ATF4, CHOP, ATF6) regulan la síntesis de numerosos factores implicados en procesos celulares básicos (metabolismo de amino ácidos, balance redox, síntesis de proteínas y lípidos, regulación de la muerte celular programada). La UPR también funciona como un mecanismo implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria. Las vías de señalización iniciadas de forma primaria por IRE1α, PERK y ATF6 pueden también activarse de forma secundaria a partir de “crosstalks” entre vías que introducen niveles de regulación adicionales de los efectos finales. Modificado de Hetz y col. (76).

A pesar de que la UPR es un mecanismo fisiológico, estudios en modelos animales han puesto de manifiesto la participación de esta respuesta en el desarrollo de diferentes patologías incluyendo cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, isquemia cerebral y cardíaca, y disfunción hepática (76). También se ha descrito que la UPR está implicada en el inicio de numerosas patologías renales como la nefropatía diabética, fibrosis renal, I/R, proteinuria o tratamiento inmunosupresor con CsA, pero a pesar de ello los mecanismos patológicos involucrados no se conocen en detalle (81). En el caso particular de los ACNs se ha demostrado que éstos inducen de forma rápida la expresión de factores de estrés de RE y activación de la UPR en células tubulares y endoteliales en cultivo, así como en el riñón *in vivo*, participando en procesos asociados a la supervivencia (autofagia, muerte celular) y a la diferenciación celular (TEM) (70,82–84). Asimismo, un elevado número de estudios reflejan que la inflamación induce estrés de retículo, y activación de la UPR, y esta a su vez es capaz de inducir inflamación aguda y crónica (77,81,85,86). La conexión entre la UPR y la activación de vías inflamatorias supone un proceso importante y de gran influencia en la patogénesis y progresión de enfermedades de origen inmunológico o metabólico. Así, el normal funcionamiento de las células del sistema inmune, endotelios y epitelios requieren de una síntesis activa de proteínas a través del RE, por lo que diversos estímulos que inducen cambios en la homeostasis de estos tipos celulares resultan en la activación de las diferentes ramas de la UPR.

La interrelación entre vías de la UPR e inflamatorias se sustenta a través de varios mecanismos, entre los que destacan la producción ROS, la liberación de calcio en el RE, así como la activación del factor nuclear NF- κ B y de las proteínas MAPK, específicamente de JNK (87). Las tres ramas de la UPR modulan señales proinflamatorias activando principalmente los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Por un lado, la vía IRE1 α de la UPR activa el complejo TRAF2-IKK, permitiendo la degradación de la proteína I κ B α y activando NF- κ B para la transcripción de los genes proinflamatorios TNF- α , TGF β , IL-2, IL-6 e IL-8. Por otro lado, es capaz de reclutar el complejo JNK/p38, activando AP-1 y resultando en un aumento en la transcripción de los genes proinflamatorios TNF- α , IL-6, IL-8 y MCP-1 (86). La vía PERK es capaz de inducir la translocación nuclear de NF- κ B de forma directa, o bien a través de la inhibición transcripcional de I κ B α mediada por PERK-eIF2 α (85,87). Por último, la vía ATF6 se caracteriza por activar NF- κ B e inflamación. En la **Figura 5** se muestra una descripción gráfica de las interrelaciones entre las diferentes ramas de la UPR activadas por estrés de RE.

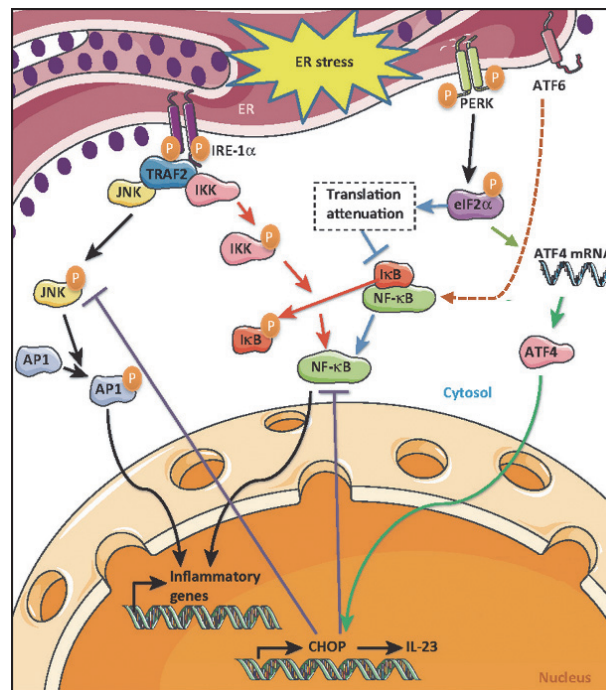


Figura 5. Regulación del proceso inflamatorio por la UPR. Las vías iniciadas por IRE1 α , PERK y ATF6 activan la síntesis de factores proinflamatorios que confluyen en la activación de NF- κ B necesaria para la síntesis de factores proinflamatorios y de CHOP. A su vez, la señalización por IRE1 α implica la activación de JNK y del factor de transcripción AP1, el cual actúa en tándem con NF- κ B. Por el contrario, CHOP es un regulador negativo de JNK y NF- κ B. Modificado de Gargy col.(85).

Investigaciones recientes señalan la UPR como uno de los procesos más importantes de numerosas patologías, centrándose en la identificación de nuevas dianas moleculares para el desarrollo de nuevas terapias, entre las que podemos encontrar inhibidores de la ruta IRE1 α , de la vía PERK, moduladores de ERAD, moduladores de la actividad de chaperonas, chaperonas químicas, potenciadores de la fosforilación del factor eIF2 α así como el uso de terapia génica (76). Recientemente, numerosos estudios en modelos experimentales han comprobado que la inhibición de la UPR mejora numerosas patologías renales. Por ejemplo, la utilización en modelos celulares y animales de chaperonas moleculares y químicas, protegen las células renales del estrés de RE inducido en FRA. El uso de la chaperona química ácido 4-fenilbutírico (PBA) reduce el estrés de RE por disminución de la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, protegiendo al riñón del daño agudo. Además, el empleo de antioxidantes como N-acetilcisteína o flavonoides reducen la producción de ROS y estrés de RE en el FRA isquémico (81).

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

La inmunidad innata y su impacto sobre la respuesta inmune adaptativa podría propiciar el daño y la pérdida de función renal. Si bien el papel de la inflamación como evento patogénico en el fracaso renal agudo y crónico está bien establecido, su participación y mecanismos en el daño renal progresivo está menos estudiado.

En investigaciones previas observamos que en células tubulares los anticalcineurínicos disparaban respuestas proinflamatorias relacionadas con la activación de la inmunidad innata o no específica. En esta tesis, hipotetizamos que mecanismos de este tipo de inmunidad, más concretamente la activación del receptor TLR4 y respuestas asociadas, podrían ser relevantes en la progresión de la toxicidad renal y vascular por anticalcineurínicos y por lo tanto en el desarrollo de patrones de daño asociados al trasplante en pacientes crónicamente tratados con estos fármacos. Además, proponemos que las propiedades antiinflamatorias de la nanomedicina QM56 podrían ser apropiadas para la inhibición de la señalización por TLR4. En general, la hipótesis de esta tesis es que TLR4 podría ser una diana terapéutica adecuada para el tratamiento de la toxicidad por anticalcineurínicos.

OBJETIVOS

1. Implementar un modelo murino para caracterizar la inflamación y nefrotoxicidad progresiva por anticalcineurínicos.
2. En este modelo, estudiar el papel de la señalización por TLR4, los mecanismos de activación del receptor y la influencia de su activación en la progresión de la inflamación, daño y función renal, y su impacto en la lesión fibrótica.
3. Estudiar efectos inflamatorios de los anticalcineurínicos en la vasculatura y verificar si ellos están mediados por el receptor TLR4.
4. Identificar si la nanomedicina QM56 inhibe la señalización y efectos proinflamatorios de TLR4 en modelos celulares y animales de daño renal.
5. Estudiar el papel de la quimioquina CCL20 y respuestas inmunes asociadas sobre la respuesta inflamatoria general inducida por CsA en el modelo murino de nefrotoxicidad.

Material y Métodos

1. MODELOS EXPERIMENTALES

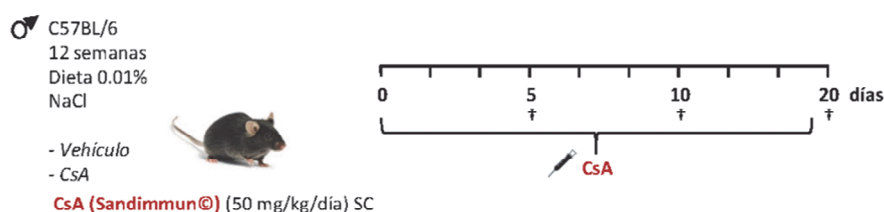
Todos los procedimientos fueron realizados acorde a la normativa del Comité Ético para la Investigación Animal de la Comunidad Europea, aprobados por el comité ético del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz y autorizados por la Dirección General de Medioambiente, Consejería de Medioambiente y Ordenación del Territorio, Comunidad de Madrid, Real Decreto 53/2013.

1.1 Animales Empleados

Los modelos animales se realizaron en ratones macho de la cepa C57BL/6 de 12 semanas (Charles River) de entre 20-25 gramos, así como en ratones macho C57BL/6 deficientes en el receptor TLR4 (TLR knock-out, TLR4^{-/-}, generosamente donados por la Dra. Consuelo Guerri, Centro de Investigación Príncipe Felipe, España; originalmente obtenidos en el laboratorio del Dr. S. Akira, Universidad Osaka, Japón). A su recepción, los animales fueron aislados en un periodo de cuarentena y su mantenimiento se realizó en jaulas convencionales o ventiladas siguiendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura constante de 25 °C y con acceso libre a comida y agua.

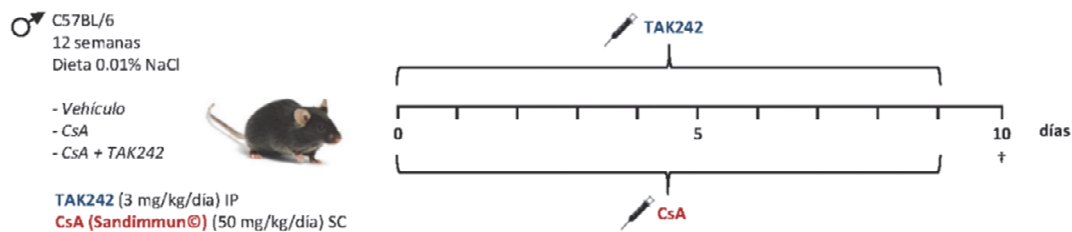
1.2 Modelo progresivo de nefrotoxicidad por CsA

Para el desarrollo del modelo progresivo de toxicidad renal, ratones C57BL/6 sometidos a dieta baja en NaCl (0,01 %, TestDiet®) recibieron inyecciones diarias de Ciclosporina A (Sandimmun® inyectable 50 mg/ml, Novartis) a una dosis 50 mg/kg/día por vía subcutánea. Los animales se dividieron en cuatro grupos, un grupo control al que se le administró el vehículo y tres grupos de animales tratados con CsA, suministrada en días consecutivos durante 5, 10 y 20 días.



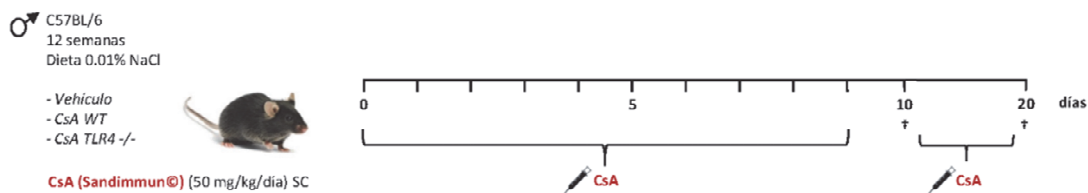
1.3 Modelo de nefrotoxicidad por CsA en cotratamiento con el inhibidor de TLR4, TAK-242

Con el fin de bloquear funcionalmente el receptor TLR4 en el modelo de nefrotoxicidad por CsA (descrito en el apartado 1.2), un grupo de ratones fue cotratado diariamente con CsA (50 mg/kg/día, s.c.) y con el fármaco inhibidor de TLR4, TAK-242 (Calbiochem), suministrado a una dosis de 3 mg/kg/día por vía intraperitoneal. Otro grupo de animales fue inyectado solamente con TAK-242. Los ratones fueron tratados durante 10 días y sacrificados a la finalización de este período.



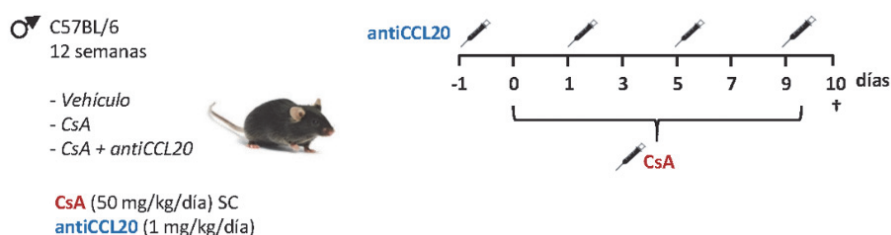
1.4 Modelo de nefrotoxicidad por CsA en ratones TLR4^{-/-}

Para desarrollar este modelo, ratones C57BL/6 wild-type (wt) y ratones deficientes en el receptor TLR4 (TLR4^{-/-}) fueron tratados con CsA (50mg/kg/día) durante 10 y 20 días en las mismas condiciones descritas anteriormente.



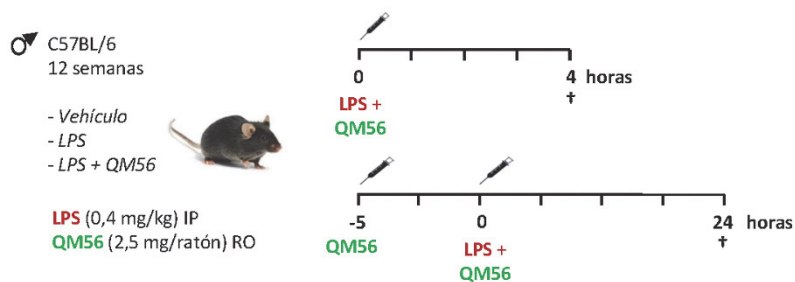
1.5 Modelo de nefrotoxicidad por CsA con bloqueo de CCL20

Con el fin de bloquear la quimioquina CCL20 en el modelo murino de nefrotoxicidad por CsA, los ratones fueron cotratados con CsA (50mg/kg/día) y con un anticuerpo neutralizante de CCL20 (R&D Systems, MAB7601), administrado en días alternos a una dosis de 1 mg/kg/día por vía intraperitoneal. El tratamiento se prolongó durante 10 días.



1.6 Modelo de daño renal agudo por LPS con administración de QM56

Ratones C57BL/6 fueron cotratados con LPS (0,4 mg/kg) por vía intraperitoneal y QM56 (2,5 mg/ratón) por vía retro orbital. Los ratones fueron sacrificados transcurridas 4 horas de tratamiento. Además, se realizó un segundo modelo donde se establecieron dos pautas de administración de QM56. La primera dosis se inyectó 5 horas previas al inicio del modelo y la segunda dosis se administró conjuntamente con la inyección de LPS. En este modelo los ratones fueron sacrificados a las 24 horas de tratamiento.



1.7 Procesamiento de los tejidos

Al finalizar el periodo de tratamiento de los modelos, los ratones fueron anestesiados con la mezcla Ketamina (Ketalar®, Pfizer; 35 mg/kg) y Xilacina (Rompun®, Bayer; 5 mg/kg) por vía intraperitoneal y sacrificados por dislocación cervical. Tras abrir la cavidad abdominal, se obtuvieron muestras de sangre de la arteria femoral y se canuló el corazón por el ventrículo izquierdo para perfundir con suero salino al 0,9%. A continuación, se extrajeron los dos riñones de cada animal, se decapsularon y se dividieron en fragmentos para su posterior conservación. Uno de los riñones se congeló en nitrógeno líquido para posterior extracción de ARN y proteínas, y el riñón restante se mantuvo sumergido en una solución de paraformaldehído al 4% y posteriormente fue incluido en parafina para estudios de inmunohistoquímica. El análisis de los parámetros de función renal (Urea y BUN) se realizó en plasma.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1 Líneas Celulares

La línea de células epiteliales de túbulo renal proximal (MCT), fue proporcionada por el Dr. Eric G. Neilson (Universidad de Vanderbilt, EEUU). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal de complementado (SBF, Sigma-Aldrich), 100 U/ml Penicilina (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml Estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 2mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich). La línea de células fibroblásticas renales de rata (NRK-49F, ATCC® CRL-1570™) se cultivó en medio DMEM 4500 mg/L Glucosa suplementado con un 5% de SBF de complementado, antibióticos y L-Glutamina. La línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7, ATCC® TIB-71™) se cultivó en medio DMEM 4500 mg/L Glucosa suplementado con un 5% de SBF de complementado, antibióticos y L-Glutamina. La línea celular endotelial de páncreas de ratón (MILE SVEN 1, ATCC® CRL-2279™) se cultivó en medio DMEM 4500 mg/L Glucosa suplementado con un 5% de SBF de complementado, antibióticos y L-Glutamina. Las células de músculo liso vascular de ratón (CMLV, ATCC® CRL-2797™) se cultivaron en medio DMEM 4500 mg/L Glucosa suplementado con un 10% de SBF de complementado, antibióticos y L-Glutamina. En todos los casos, las células fueron crecidas hasta una confluencia aproximada del 70% y se mantuvieron en medio de cultivo sin SBF durante 24 horas previo al inicio de los tratamientos. Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubador bajo condiciones estables de temperatura (37°C), presión parcial de CO₂ (5%) y humedad relativa (95%).

2.2 Estímulos e Inhibidores utilizados

Compuesto	Dosis	Disolvente	Casa Comercial
Ciclosporina A (CsA)	10 µg/ml	Etanol	Calbiochem
Tacrolimus (Tac, FK506)	20 µg/ml	Etanol	Calbiochem
LPS	0,1-1 µg/ml	H ₂ O	Sigma-Aldrich
LTA	10 µg/ml	H ₂ O	Sigma-Aldrich
PMA	100 ng/ml	DMSO + H ₂ O	Sigma-Aldrich
TNF-α	10 ng/ml	H ₂ O	Peprtech
TGFβ	10 ng/ml	H ₂ O + 0,1% BSA	Peprtech

Tabla 1. Estímulos utilizados durante la experimentación. Se muestra la concentración de ensayo, el disolvente y la casa comercial del reactivo.

Compuesto	Diana	Dosis	Disolvente	Casa Comercial
Salubrinal	eIF2-α	100 µM	DMSO	Calbiochem
Ácido 4-Fenilbutírico (PBA)	UPR	10 mM	RPMI 1640	Sigma-Aldrich
4µ8c	IRE1-α	25 µM	RPMI 1640	Calbiochem
compd	IRE1-α	100 µM	RPMI 1640	Sigma-Aldrich
TAK-242	TLR4	10 µM	DMSO + DMEM	Calbiochem
ZVAD-fmk	Caspasas	25 µM	DMSO + H ₂ O	Bachem
Glicirricina (GA)	HMGB1	1 mM	RPMI 1640	Sigma-Aldrich
Apocinina	NAD(P)-oxidasa	10 mM	DMSO + etanol	Sigma-Aldrich
Difenilyodonio (DPI)	NAD(P)-oxidasa	10 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
QM56	Apaf-1	20 µM	PBS	Lab. Dra MJ Vicent

Tabla 2. Inhibidores utilizados durante la experimentación. Se muestra la diana específica, la concentración de ensayo, el disolvente y la casa comercial del reactivo.

3. ESTUDIOS *EX VIVO*

3.1 Estudios en macrófagos peritoneales de ratón

Ratones C57BL/6 fueron inyectados con una solución de Tioglicolato (Sigma-Aldrich) preparado al 3% en PBS estéril con el fin de promover la migración de macrófagos hacia la cavidad peritoneal. Transcurridos 4 días, los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂ y posteriormente se les inyectó en el abdomen 10 ml de medio RPMI 1640/SBF 10% frío. Tras un masaje suave del abdomen y con la misma aguja, se procedió a retirar el máximo volumen de medio de la cavidad peritoneal, depositándose en un tubo previamente enfriado. Tras la recolección de las células, se centrifugaron 5 minutos a 2500 rpm, posteriormente se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con SBF 10% y finalmente se procedió a su conteo y siembra en placas de cultivo. El medio de cultivo se sustituyó por RPMI suplementado con SBF 0,5% al inicio de los tratamientos. Al finalizar los experimentos, se recolectó el sobrenadante de las placas de cultivo para estudios de proteínas por ELISA.

3.2 Estudios en aorta de ratón *ex vivo*

Ratones C57BL/6 wt o TLR4^{-/-} fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical. Las aortas fueron diseccionadas, aisladas de grasa y de tejido conectivo, y divididas en segmentos. Se mantuvieron en placas con medio DMEM suplementado con 10% SBF 12 horas a 37 °C para recuperar el estado metabólico basal del tejido. Posteriormente, los segmentos aórticos se incubaron con medio DMEM 1% SBF y se trataron con CsA o Tac durante 6 horas, en presencia o ausencia del inhibidor TAK-242. Al final de los tratamientos, los segmentos aórticos se fijaron en PFA 4% y se incluyeron en parafina para estudios de inmunohistoquímica o en O.C.TTM (Tissue Tek®, Sakura) para estudios de inmunofluorescencia. El resto de secciones se congelaron en nitrógeno líquido para el análisis génico y proteico.

4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

4.1 Extracción de proteínas totales

Las proteínas totales de tejido y células se extrajeron empleando una solución tampón compuesto por TrisHCL 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaF 25 mM, Tritón X-100 0,2%, NP-40 0,3%, PMSF 0,1% suplementado con el inhibidor comercial de proteasas (CCompleteTM, Roche Diagnostics) y con el inhibidor comercial de fosfatasa (PhosSTOPTM, Roche Diagnostics). La concentración de proteínas se cuantificó mediante el método del BCA (ácido bicinonínico, Pierce).

4.2 Extracción de proteínas citoplásmicas y nucleares

La extracción y separación de proteínas citoplásmicas y nucleares de tejido y de células se realizó según protocolo mediante el reactivo comercial NE-PER® (ThermoFisher). La concentración de proteínas se cuantificó mediante el método del BCA (ácido bicinónico, Pierce).

4.3 Western Blot

Las proteínas procedentes de lisados celulares o tisulares (30-50 µg), o bien de sobrenadantes celulares, fueron mezcladas con solución tampón de carga (Tris 1M pH 6,8, Glicerol 30%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,4%, p/v DTT 7,6%) y desnaturalizadas durante 5 minutos a 95 °C. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (8-12%) en condiciones reductoras. Una vez separadas, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en Tris 25mM pH 8,3, glicina 150 mM y metanol 20%. Las membranas se bloquearon durante al menos 1 hora en TBS/Tween 0,5% y leche desnatada 5% para evitar uniones inespecíficas y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 3**), diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C y en agitación constante. Al día siguiente, las membranas se lavaron en TBS/Tween 0,5% un mínimo de 3 veces durante al menos 10 minutos por lavado, para eliminar el exceso de anticuerpo primario y uniones inespecíficas. Por último, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa o biotina (**Tabla 4**), durante 1 hora en agitación suave. En el caso de las membranas expuestas a los anticuerpos secundarios biotinilados, éstas fueron incubadas posteriormente con el reactivo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC HRP system) como potenciador de la señal. Tras lavar las membranas para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, las bandas se revelaron mediante quimioluminiscencia con reactivo ECL (Millipore) y se detectaron con el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Posteriormente, las imágenes se analizaron con el programa Quantity One (Bio-Rad).

5. ELISA

La concentración de citoquinas en sobrenadantes celulares fue determinada mediante enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) según protocolo específico de la casa comercial (BD OptEIA de BD Bioscience y DuoSet de R&D Systems) empleando una curva estándar de las citoquinas recombinantes y el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para la detección colorimétrica. La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA, expresando los valores en pg/ml. Cada ELISA se desarrolló según protocolo específico de la casa comercial.

6. ANÁLISIS DE ARN

6.1 Extracción de ARN

El ARN total procedente de cultivos celulares o de muestras de tejido congelado (riñón y aorta) se extrajo siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante para el reactivo TriPure (Roche Diagnostics). Se cuantificó el ARN total en un espectrofotómetro tipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) por medida de absorbancia a 260 nm. La pureza de la muestra se comprobó mediante los cocientes de absorbancia 260/280 y 260/230 nm, cuyos valores mayores de 1,8 indicaron ausencia de contaminación proteica y fenólica respectivamente.

6.2 PCR cuantitativa a tiempo real

Para obtener ADNc realizamos un procedimiento de transcripción reversa a partir de 1-2 µg de ARN usando el reactivo High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) en un termociclador convencional (PTC-100, MJ Research Inc) con las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 2 horas a 37 °C y 5 minutos a 85 °C. La PCR a tiempo real se llevó a cabo mediante el sistema de detección secuencial Taqman ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) usando el método $\Delta\Delta C_t$. Las preparaciones se realizaron con el preparado comercial Master Mix (Roche Diagnostics) conteniendo la TaqDNA polimerasa activada por calor, así como nucleótidos y tampón necesarios para la reacción, junto con la muestra de ADNc y el cebador específico comercial de cada gen diana. En la misma reacción (multiplex) o como reacción independiente (singleplex) se añadieron cebadores para amplificar también el ARN del gen que codifica la Gliceraldehído-Fosfato-Deshidrogenasa (GAPDH) como control interno de la reacción. La secuencia del programa de PCR a tiempo real fue: un paso inicial de 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C, tras el cual las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Los resultados de la amplificación del gen diana se normalizaron con los datos obtenidos de los transcritos controles. Las sondas prediseñadas utilizadas se obtuvieron de Applied Biosystems (**Tabla 5**).

7. INMUNOFLUORESCENCIA

7.1 Células en cultivo

Una vez cultivadas las células en placas de 24 pocillos sobre discos de cristal y transcurrido el tiempo de los tratamientos, se retiró el medio, se realizaron varios lavados con PBS y se fijaron las células con PFA 4%. Tras un lavado con PBS/Glicina 5%, se incubaron 15 minutos con Tritón X-100 al 0,2% (Sigma-Aldrich) para permeabilizar la membrana celular. Pasado este tiempo, se lavaron y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA 4%/suero 10% (de la especie de origen del anticuerpo secundario) en PBS para eliminar posibles uniones inespecíficas. Posteriormente, los discos se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C en agitación suave (**Tabla 3**). Tras lavados con PBS, los discos se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave (**Tabla 4**). Los núcleos se contrastaron con DAPI (Sigma-Aldrich) y finalmente los cubreobjetos, con las células adheridas, se montaron con Mowiol (Sigma-Aldrich) sobre portaobjetos de cristal y la fluorescencia se detectó mediante microscopía confocal (Confocal System TCS SP5, Leica).

7.2 Tejido

7.2.1 Detección de TLR4 en riñón

Las muestras de tejido renal incluidos en parafina fueron cortadas con micrótopo en secciones de 2 µm y montadas en portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina (Dako FLEX IHC). Para el desparafinado e hidratación del tejido, las muestras se mantuvieron en estufa a 60 °C durante 1 hora y se les aplicó un protocolo de recuperación antigénica utilizando el sistema PT Link (Dako Diagnostics) con tampón citrato sódico 10 mM ajustado a pH 9. La peroxidasa endógena se bloqueó incubando las muestras 15 minutos con H₂O₂ al 3%, mientras que las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se bloquearon utilizando un péptido bloqueante (Santa Cruz, sc-16240P) diluido 1:50 en PBS/BSA 4% y 10% de suero procedente de conejo. Posteriormente se incubó el tejido con el anticuerpo específico αTLR4 toda la noche a 4 °C (**Tabla 3**). Tras lavar el tejido con la solución PBS-T, se incubó con anticuerpo secundario AlexaFluor® 633 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad (**Tabla 4**). Finalmente, y tras lavar el anticuerpo secundario, las muestras se montaron con Mowiol sobre cubreobjetos de cristal y la fluorescencia se detectó mediante microscopía confocal.

7.2.3 Detección de CD31/p65 y α -SMA/p65 en aorta

Tras el tratamiento de los cultivos de aorta *ex vivo*, los segmentos aórticos se mantuvieron en una solución de Krebs Henseleit-HEPES (KHS-HEPES, en mM; 115 NaCl; 25 HEPES; 4,7 KCl; 1,2 MgSO_4 ; 7 H_2O ; 2,5 CaCl_2 ; 1,2 KH_2PO_4 ; 11,1 glucosa y 0,01 Na_2EDTA) al 30% de sacarosa durante 20 min y finalmente se conservaron en O.C.T a -80°C . Utilizando un criostato se realizaron cortes de $4\text{ }\mu\text{m}$ de las muestras incluidas en O.C.T, y se colocaron sobre portaobjetos tratados con polilisina para aumentar la adherencia del tejido. Los tejidos se bloquearon con una solución PBS/BSA 1%/FBS 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con la combinación de anticuerpos primarios específicos: CD31 (1:50) / p65 (1:50) y α -SMA-FitC (1:300) / p65 (1:50) (**Tabla 3**) durante toda la noche a 4°C . Tras lavar el tejido con la solución PBS-T, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos secundarios: AlexaFluor® 488 / AlexaFluor® 568 y AlexaFluor® 633 (**Tabla 4**). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI, las muestras fueron montadas con Mowiol sobre cubreobjetos de cristal y la fluorescencia detectada mediante microscopía confocal.

7.2.4 DHE en aorta

Para evaluar la producción de ROS (específicamente $\text{O}_2^{\cdot-}$) en aorta, se utilizó la sonda oxidativa fluorescente dihidroethidio (DHE; Invitrogen), compuesto que penetra en las células y al ser oxidado por el anión superóxido se intercala en el ADN y emite señal fluorescente en rojo. Para los experimentos *ex vivo* se equilibraron los segmentos aórticos en KHS-HEPES durante 30 min y posteriormente se realizaron los diferentes tratamientos. Se realizaron cortes de $4\text{ }\mu\text{m}$ de las muestras incluidas en O.C.T en criostato y se recogieron en portaobjetos tratados. Los cortes fueron equilibrados con KHB-HEPES (30 min, 37°C) e incubados con KHS-HEPES fresco con DHE ($5\text{ }\mu\text{M}$, 30 min, 37°C). Tras retirar la solución DHE, se montaron en cubreobjetos utilizando el reactivo Prolong Gold (Invitrogen) y posteriormente analizados por microscopía confocal.

8. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras de tejido renal incluidos en parafina fueron cortadas con micrótopo en secciones de 2 μm y montadas en portaobjetos tratados con polilisina. Tras el proceso de desparafinación de 1 hora a 60 °C, se realizó el protocolo de recuperación antigénica utilizando el sistema PT Link (Dako Diagnostics) con tampón citrato sódico 10 mM ajustado a pH 6 o 9 según la proteína de interés. La peroxidasa endógena se bloqueó incubando las muestras 15 minutos con H_2O_2 al 3%, mientras que las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se bloquearon utilizando la solución PBS/BSA 4%/suero 10% (de la misma especie en que se produjo el anticuerpo secundario). Posteriormente se incubó el tejido con el anticuerpo específico toda la noche a 4 °C (**Tabla 3**). Tras lavar el tejido con la solución PBS-T, se incubó con anticuerpo secundario biotinilado o bien con el sistema Dako Real EnVision+ rabbit/mouse HRP, 1 hora a temperatura ambiente (**Tabla 4**). Tras lavar el anticuerpo secundario biotinilado, se incubaron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC HRP system; Vector laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se revelaron utilizando la 3,3'-diaminobencidina como sustrato (Dako), se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron, se fijaron en xilol y se montaron utilizando DPX. Las preparaciones fueron analizadas mediante microscopía óptica. Las tinciones inmunohistoquímicas se cuantificaron utilizando el software Image Pro-Plus (Media Cybernetics) a partir de imágenes de al menos 10 campos por sección renal a un aumento de x200. La tinción positiva se expresó tanto como porcentaje de área teñida respecto del área total evaluada de cada muestra como por el número de células positivas por área del campo evaluado.

Anticuerpo primario			
Antígeno	Dilución	Referencia	Casa Comercial
F4/80	1:50	MCA497	BioRad
CD3	Ready to use	A0452	Dako
ICAM-1	1:100	sc-8439	Santa Cruz
CD31/PECAM	1:100	sc-1506	Santa Cruz
NFκB/p65	1:50	sc-372	Santa Cruz
p-IKBA	1:1000	#2859	Cell Signaling
IKBA	1:1000	sc-371	Santa Cruz
p-IRE1α	1:1000	ab48187	Abcam
IRE1α	1:200	Ls-B680	LSBio
XBP1	1:100 – 1:1000	sc-32136	Santa Cruz
CHOP	1:1000	sc-575	Santa Cruz
TLR4	1:100	sc-16240	Santa Cruz
HMGB1	1:1000	ab18256	Abcam
COL-1	1:5000	AB765P	Millipore
FN-1	1:5000	AB2033	Millipore
MIP-3α/CCL20	1:1000	ab9829	Abcam
p-JNK	1:2500	#4668	Cell Signaling
p-c-Jun	1:200 – 1:1000	3270S	Cell Signaling
FN14	1:50	4403S	Cell Signaling
CD4	Ready to use	IS649	Dako
α-SMA-FitC	1:300	F3777	Sigma-Aldrich
STAT3	1:100	#8768S	Cell Signaling
MPO	Ready to use	IS511	Dako
Tubulina α	1:5000	T5168	Sigma-Aldrich
Gliceraldeído-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH)	1:5000	CB1001	Millipore
DAPI	1:10000	D9564	Sigma-Aldrich

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados durante la experimentación. Se muestra el antígeno específico, la dilución de ensayo, la referencia y la casa comercial del reactivo.

Anticuerpo secundario			
Anti-mouse HRP	1:5000	10196124	General Electric
Anti-rabbit HRP	1:5000	10794347	General Electric
Anti-mouse biotina	1:5000	AP-124B	Millipore
Anti-rabbit biotina	1:5000	AP-132B	Millipore
AlexaFluor® 488	1:250	A21202	Life Technologies
AlexaFluor® 568	1:250	A11011	Life Technologies
AlexaFluor® 633	1:250	A2105	Life Technologies

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados durante la experimentación. Se muestra la dilución de ensayo, la referencia y la casa comercial del reactivo.

Gen (ratón)	Código de la sonda	Gen (ratón)	Código de la sonda
Ccl2/Mcp1	Mm00441242_m1	Irf1	Mm01288580_m1
Ccl5/Rantes	Mm01302428_m1	Tlr4	Mm00445273_m1
IL6	Mm00446190_m1	Tnfrsf1/Fn14	Mm00489103_m1
Icam1	Mm00516023_m1	Lcn2	Mm01324470_m1
Vcam1	Mm01320970_m1	Ddit3/Chop	Mm011359937_g1
Edn1	Mm00438656_m1	Ern1/Ire1	Mm00470233_m1
Sele	Mm01310197_m1	Atf3	Mm00476032_m1
Col1	Mm00483888_m1	Atf4	Mm00515325_g1
Fn1	Mm01256744_m1	Atf6	Mm01295317_m1
Pal1/serpina	Mm00435858_m1	GAPDH	Mm99999915_g1
TGFβ	Mm01178820_m1	Tlr4	Mm00445273_m1
cxcl10/IP10	Mm00445235_m1		
Myd88	Mm00440338_m1	Gen (rata)	Código de la sonda
IL1β	Mm00434228_m1	Ccl2 (MCP1)	Rn005805555_m1
Havcr1/kim1	Mm00506686_m1	PAI-1	Rn01481341_m1
Tnfα	Mm00443260_g1	GAPDH	Rn99999916_s1
Hmgb1	Mm00849805_m1		
Ccl20	Mm01268754_m1		
Ifit1	Mm00515153_m1		
Irf7	Mm00516793_g1		

Tabla 5. Listado de sondas murinas empleadas en PCR cuantitativa en tiempo real.

9. TINCIONES HISTOLÓGICAS

Las muestras de tejido renal de ratón incluidas en parafina fueron cortadas con micrótopo en secciones de 2-4 μm y montadas en portaobjetos tratados con polilisina. Para el desparafinado e hidratación del tejido, las muestras se mantuvieron en estufa a 60 °C durante 1 hora y posteriormente se incluyeron en xileno y en un gradiente decreciente de alcohol etílico (100°, 96° y 70°). Para el estudio morfológico del riñón se realizaron las tinciones Hematoxilina/Eosina y PAS según protocolo establecido (Bio-Optical). Las lesiones renales se cuantificaron mediante un índice numérico de daño tubulointersticial asociado a un puntaje global de 0 a 21 y caracterizado por los siguientes parámetros: dilatación tubular, necrosis tubular, atrofia tubular, formación de depósitos en la luz tubular y vacuolización citoplásmica. A cada uno de estos parámetros se le asignó un puntaje de 0 a 3. La evaluación de la fibrosis se llevó a cabo mediante tinción de Tricrómico de Masson según protocolo establecido (Bio-Optical). A los cortes rehidratados se les añadió la solución de hematoxilina de Weigert durante 7 minutos. Seguidamente, los cortes se lavaron y luego se les añadió como mordiente ácido pícrico durante 5 minutos. Tras lavar las muestras se añadió fucsina de Ponceau y ácido fosfomolibdico durante 2 minutos. Para finalizar se añadió el colorante verde luz durante 10 minutos. Se procedió a deshidratar los cortes, fijar en xilol y montar en DPX (Fisher). Para cuantificar los depósitos tubulointersticiales de colágeno por tinción de Rojo Picrosirio, los cortes desparafinados se rehidrataron durante 5 días en etanol 70° a 4 °C, se lavaron con agua y se tiñeron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una solución formada por la mezcla de ácido pícrico (Sigma-Aldrich) y direct red (Sigma-Aldrich). Seguidamente se deshidrataron y se montaron con DPX.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados experimentales se analizaron estadísticamente mediante el programa SPSS 12.0 empleando el test paramétrico de t de Student y test no paramétrico de Mann-Whitney, expresándose como la media aritmética \pm error estándar de la media (EEM). Para la validación estadística de los resultados se estableció una $p \leq 0,05$. Los ensayos *in vitro* fueron replicados un mínimo de 3 veces y en los modelos *in vivo* se emplearon un mínimo de 5 ratones por cada situación experimental.

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN DE LA INFLAMACIÓN Y DE RESPUESTAS PATOGENICAS ASOCIADAS EN UN MODELO MURINO PROGRESIVO DE NEFROTOXICIDAD POR CICLOSPORINA A

Estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que los anticalcineurínicos (ACNs) activan numerosas vías proinflamatorias en células tubulares renales en cultivo. Con el fin de estudiar la ocurrencia y temporalidad de las respuestas inflamatorias inducidas por los ACNs en el riñón *in vivo*, y establecer su relación con otras respuestas patogénicas (daño tubular, fibrosis, alteraciones vasculares y pérdida de función renal), se diseñó e implementó un modelo de nefrotoxicidad por CsA basado en la utilización de una forma farmacéutica comercial de este inmunosupresor denominada Sandimmun® (Novartis) administrada por vía subcutánea en grupos de ratones tratados durante 5, 10 y 20 días. El desarrollo de este modelo también tuvo por objetivo caracterizar respuestas específicas de la inflamación, identificar potenciales dianas moleculares terapéuticas y estudiar el rol funcional de estas respuestas y moléculas inflamatorias en la progresión de la nefrotoxicidad por CsA en particular y en la inflamación renal en general. La utilización de Sandimmun® presenta ventajas sobre preparaciones no farmacéuticas de uso experimental, principalmente una solubilidad óptima del principio activo que asegura una mejor absorción y por lo tanto menor variabilidad interindividual en los modelos animales.

1.1 La CsA induce inflamación renal progresiva

En el modelo murino de inyección sistémica de CsA, se evaluó en primer lugar la respuesta génica de citoquinas y factores proinflamatorios como indicadores del proceso inflamatorio renal inducido por el inmunosupresor. Así, la administración diaria de CsA indujo un rápido aumento en los niveles de expresión génica de las citoquinas proinflamatorias MCP-1, IP-10 e IL-6 tras 5 días de tratamiento, los cuales permanecieron incrementados después de 10 y 20 días de tratamiento (**Figura 1A**). Además, se observó un aumento en los niveles transcripcionales de ICAM-1, SELE y especialmente de VCAM-1 a partir de los 5 días y con máxima inducción a los 20 días de tratamiento, lo que sugería una destacada activación endotelial (**Figura 1B**). Por otra parte, en los riñones de los ratones tratados con CsA durante 20 días se confirmó mediante inmunofluorescencia un aumento en la síntesis proteica de ICAM-1 en los endotelios peritubulares (**Figura 1C**).

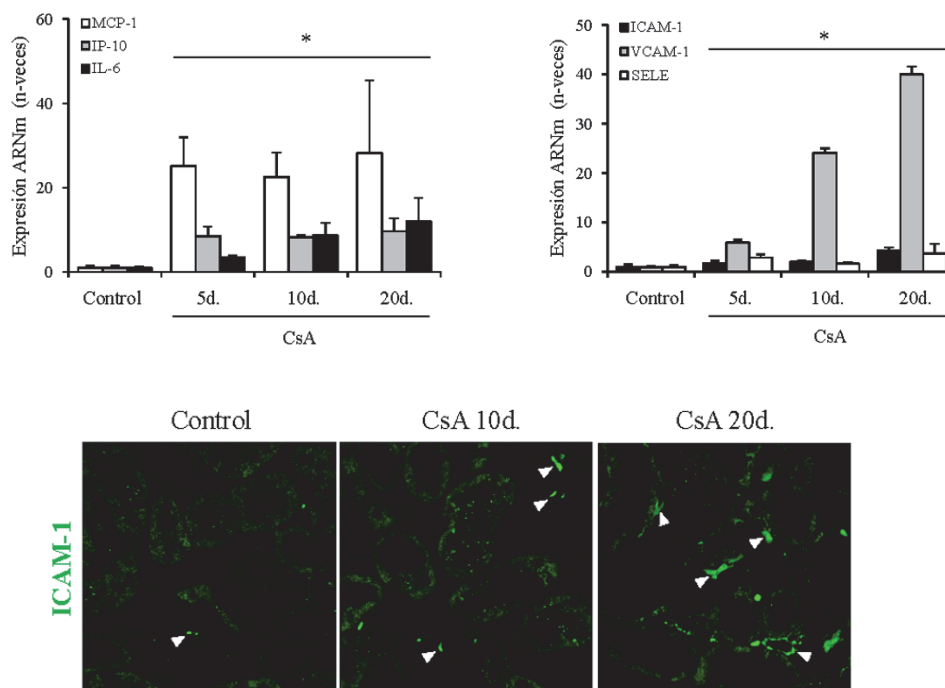


Figura 1. La CsA aumenta la expresión renal de mediadores inflamatorios *in vivo*. (A-B) Análisis por PCR de la expresión génica renal de mediadores inflamatorios tras la administración de CsA en ratones durante 5, 10 y 20 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control. (C) Inmunofluorescencia de ICAM-1 (verde) en tejido renal de ratones tratados con CsA durante 10 y 20 días. La figura muestra imágenes representativas de todos los grupos experimentales analizados. Las puntas de flecha indican la localización peritubular de la marca específica, la cual incrementa su intensidad en función del tiempo de tratamiento con CsA. Magnificación original 400x.

La respuesta inmune innata se activa de forma intrínseca como parte de la respuesta inflamatoria renal. Así, comparando los niveles transcripcionales basales detectados en los ratones control, los riñones de los ratones tratados con CsA exhibieron una mayor expresión génica del receptor TLR4 y de genes de la vía de señalización de receptores de la familia TLR, como el adaptador Myd88 e IFIT1, a lo largo de todo el periodo de tratamiento (5 a 20 días) (Figura 2).

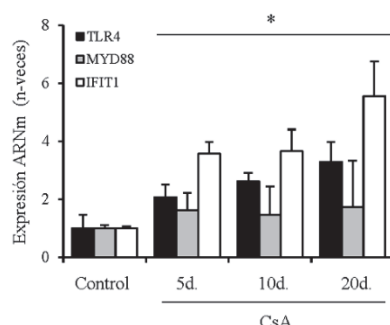


Figura 2. La CsA induce la expresión renal de marcadores relacionados con la respuesta inmune innata *in vivo*. Niveles transcripcionales de TLR4, Myd88 e Ifit1 analizados por PCR en ratones control sin tratamiento y en ratones tratados con CsA durante 5, 10 y 20 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control.

Basados en resultados de arrays genómicos que nos permitieron identificar genes de la respuesta UPR con expresión diferencial en células tubulares tratadas con CsA (resultados mostrados en el capítulo 4), algunos de los cuales pueden participar como reguladores de la inflamación, estudiamos esta respuesta en el modelo *in vivo* de nefrotoxicidad por CsA. De este modo, se observó una leve pero significativa inducción de CHOP y ATF4 a partir de los 5 días de tratamiento con CsA, respuesta que se mantuvo constante en animales tratados durante 10 y 20 días (**Figura 3A**). También se detectó una inducción rápida y de mayor magnitud de ATF3, un represor transcripcional asociado a estrés con actividad inhibitoria sobre la señalización por TLR4 (**Figura 3B**).

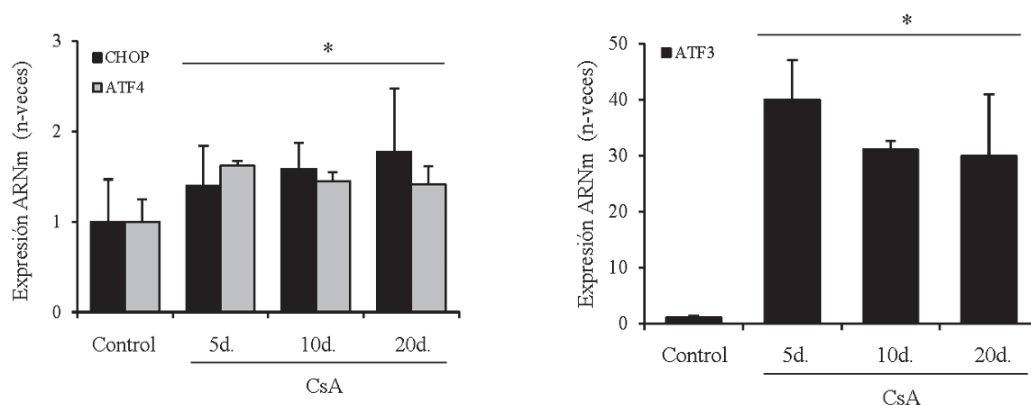


Figura 3. La CsA incrementa la expresión renal de marcadores relacionados con la respuesta UPR *in vivo*.

(A-B) Análisis por PCR de la expresión de marcadores de la respuesta UPR ligada a estrés de retículo tras la administración de CsA en ratones durante 5, 10 y 20 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control.

Finalmente, se evaluó la presencia de células inmunes infiltrantes como marcador global del proceso inflamatorio. Así, el continuo aumento de la expresión génica y proteica de los mediadores inflamatorios (citoquinas y quimioquinas, marcadores de activación endotelial, receptores de la inflamación y genes de UPR) a través de todo el período de tratamiento con CsA se correspondió con un incremento transitorio de infiltrado renal de neutrófilos (MPO⁺) tras 5 días de tratamiento (**Figura 4A**), así como por el aumento progresivo del infiltrado de células mononucleares fagocíticas (F4/80⁺) y linfocitarias (CD3⁺) a los 10 y 20 días (**Figura 4B**).

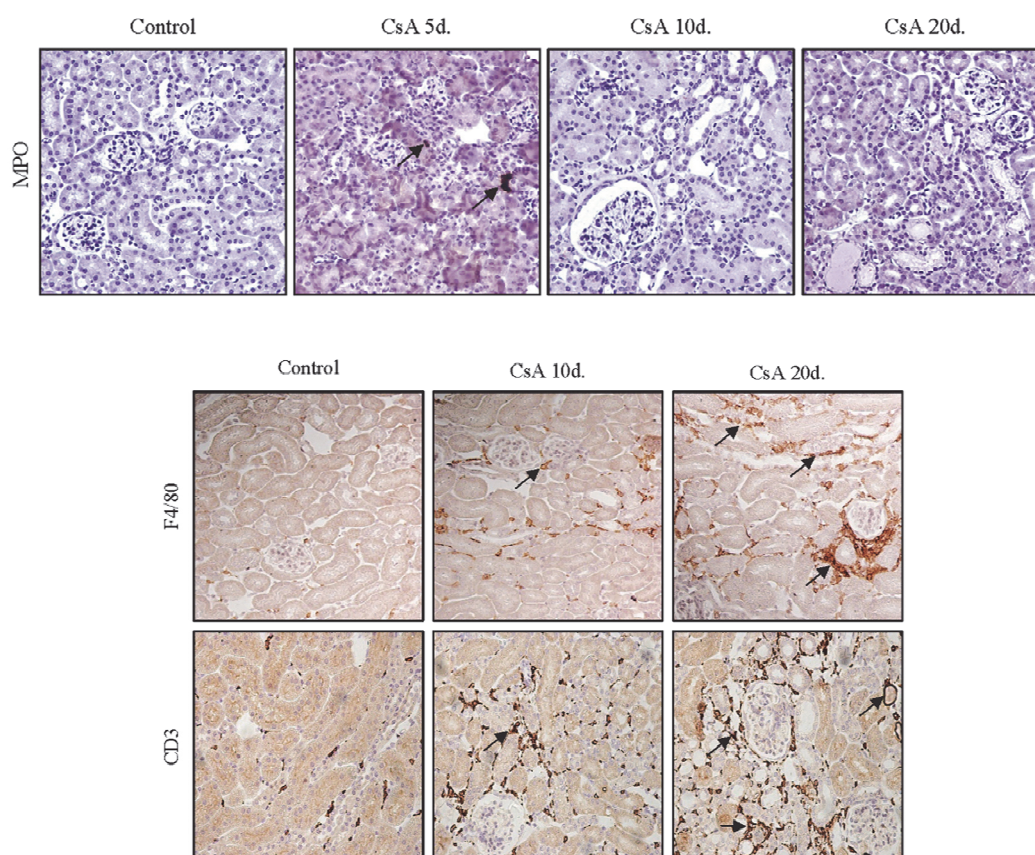


Figura 4. La CsA promueve la movilización de células inflamatorias infiltrantes en el riñón *in vivo*. Microfotografías representativas de la inmunodetección de neutrófilos MPO⁺ en riñones de ratones tratados con CsA durante 5, 10 y 20 días **(A)** y de células fagocíticas F4/80⁺ (panel superior) y linfocíticas CD3⁺ (panel inferior) en tejido renal de ratones tratados con CsA durante 10 y 20 días **(B)**. En ambas figuras, las flechas indican la localización tubulointersticial de la marca específica. Magnificación original 200x.

1.2 La CsA induce fibrosis posterior a la aparición de inflamación

La administración de CsA a largo plazo se relaciona con lesiones renales crónicas, típicamente con la aparición de fibrosis. La inflamación renal está intrínsecamente relacionada con el inicio y evolución del proceso fibrótico. Con el objetivo de estudiar el curso temporal de la respuesta fibrótica renal y su relación con la respuesta inflamatoria, se caracterizó la respuesta de genes profibróticos y la formación de depósitos de tejido conectivo en el modelo *in vivo* de administración de CsA. En primer lugar, los ratones tratados con CsA mostraron un incremento tiempo-dependiente de los niveles transcripcionales de COL-1, FN-1, PAI-1 y TGFβ, genes clave en el desarrollo del proceso fibrótico **(Figura 5A)**. Sin embargo, a pesar de la rápida inducción de genes profibróticos, el aumento en la síntesis de proteínas de matriz en el intersticio renal no fue detectado en los ratones tratados con

CsA durante 5 y 10 días. En cambio, los ratones tratados durante 20 días mostraron un notable aumento en los depósitos de tejido conectivo tubulointersticial detectados por tinción tricrómica de Masson, indicativo de un proceso fibrótico establecido (**Figura 5B**). Estos resultados sugirieron que la inflamación podría preceder a la fibrosis, y, por lo tanto, ser un condicionante patogénico de la lesión crónica renal por CsA.

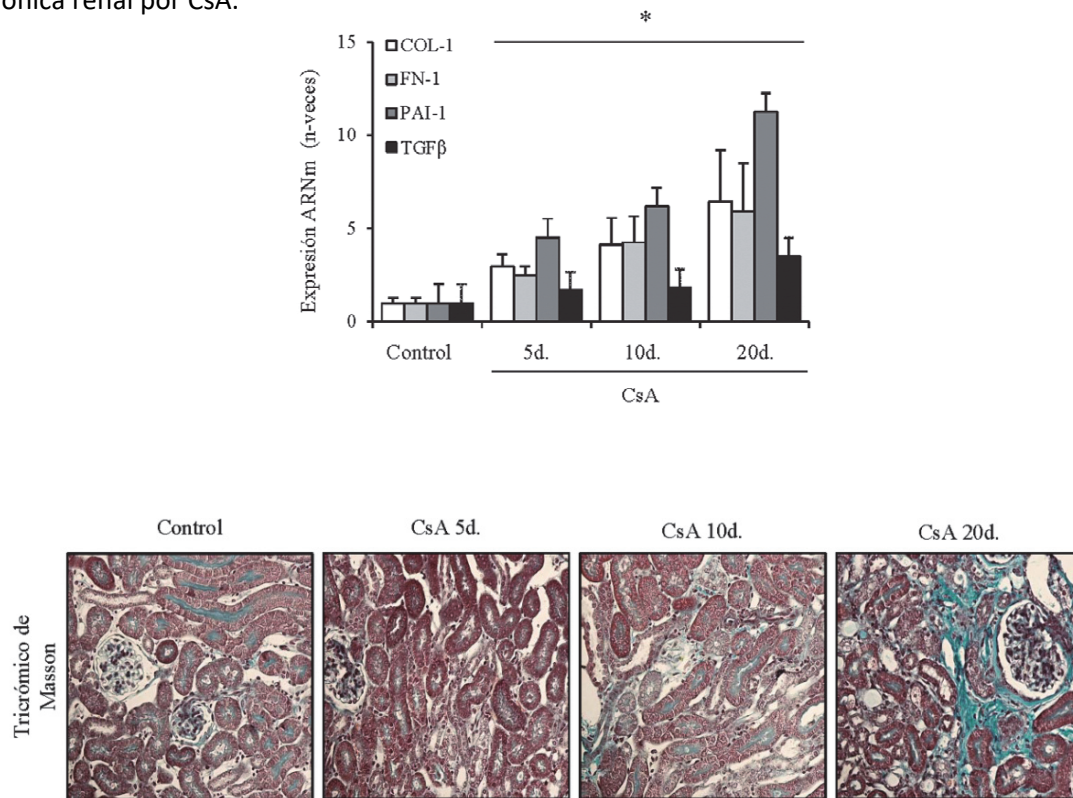


Figura 5. La CsA promueve la expresión progresiva de genes profibróticos y la síntesis de matriz extracelular *in vivo*. (A) Análisis por PCR de la expresión de mediadores profibróticos tras la administración de CsA en ratones durante 5, 10 y 20 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control. (B) Microfotografías representativas de la tinción Tricrómica de Masson en tejido renal de ratones control y tratados con CsA durante 5, 10 y 20 días. En verde destacan los depósitos de tejido conectivo (CsA 20 días). Magnificación original 200x.

1.3 La CsA induce daño tubular en el riñón

La administración crónica de CsA en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor conduce a la aparición de alteraciones irreversibles en los diferentes compartimentos estructurales del riñón, incluyendo tubulointersticio, arteriolas y glomérulos (16). Para estudiar la progresión de la lesión tisular provocada por la CsA en nuestro modelo murino, se evaluó en primer lugar la respuesta génica de marcadores moleculares relacionados con el daño tubular. Se observó un rápido aumento de los niveles de expresión génica de KIM-1 y NGAL tras 5 días de tratamiento, detectándose mayormente

expresados a los 10 y 20 días posteriores (**Figura 6A**). Mediante tinción de hematoxilina/eosina se evaluó el daño histológico, observándose un patrón de daño tubular progresivo a partir de los 10 días y siendo más acusado a los 20 días. Estas lesiones esencialmente tubulares se caracterizaron por dilatación y vacuolización, pérdida de celularidad y formación de depósitos intraluminales hialinos (**Figura 6B**).

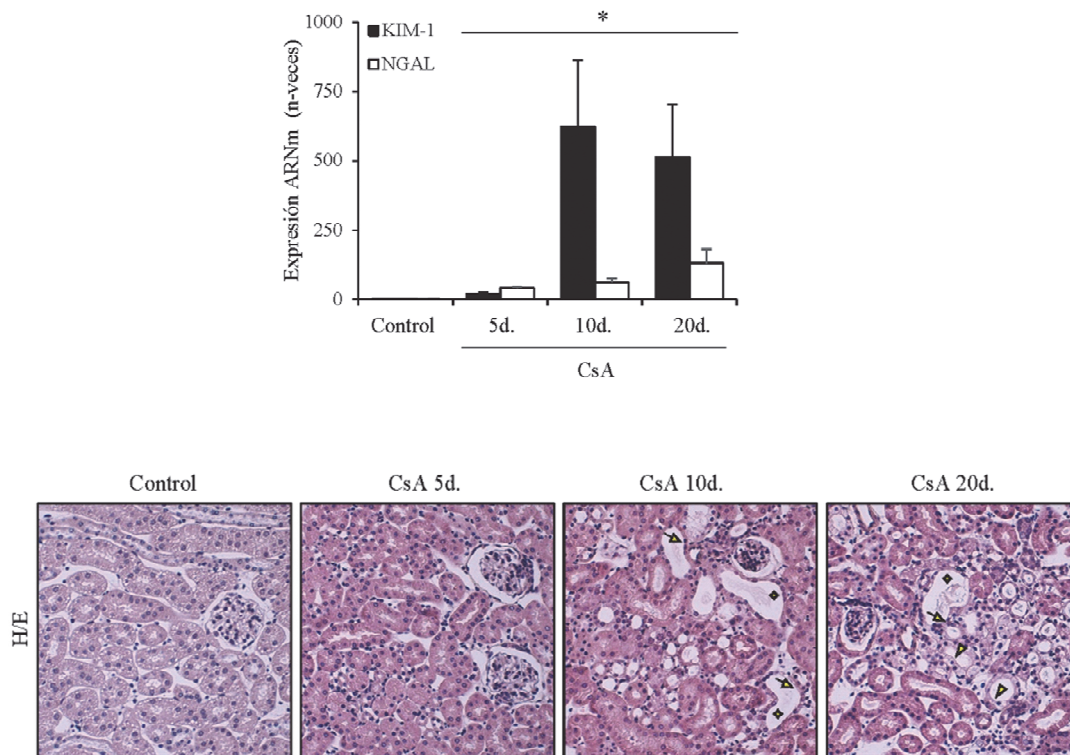


Figura 6. La CsA induce daño tubular progresivo *in vivo*. (A) Análisis por PCR de la expresión de marcadores moleculares del daño tubular tras la administración de CsA en ratones durante 5, 10 y 20 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control. (B) Microfotografías representativas de la tinción Hematoxilina/Eosina en tejido renal de ratones controles y tratados con CsA durante 5, 10 y 20 días. Las flechas indican dilatación tubular, las puntas de flecha indican vacuolización citoplásmica y los diamantes la formación de depósitos hialinos en la luz del túbulo. Magnificación original 200x.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se consideró que el modelo de administración de CsA durante 10 días era el más adecuado para indagar mecanismos moleculares de la inflamación, así como su papel en la progresión de la nefrotoxicidad por ACNs.

2. PAPEL *IN VIVO* DE TLR4 EN LA NEFROTOXICIDAD MEDIADA POR CsA

2.1 La administración sistémica de CsA incrementa la expresión renal de TLR4

La implicación de TLR4 en la nefrotoxicidad mediada por CsA fue propuesto en algunos estudios que describieron un aumento de expresión de este receptor en modelos experimentales de nefrotoxicidad por CsA o en biopsias renales de pacientes tratados crónicamente con CsA (88,89). Sin embargo, no hay estudios funcionales que apoyen esta hipótesis y, por lo tanto, el papel de TLR4 en la patogenia del daño renal por CsA es aún desconocido. Estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio demuestran que TLR4 es un mediador de los efectos proinflamatorios inducidos por CsA en cultivo de células tubulares renales (90). Por ello, uno de los objetivos principales de esta tesis fue investigar la posible participación de TLR4 en el proceso inflamatorio renal inducido por CsA. Para ello, y sobre la base de nuestro modelo murino de nefrotoxicidad por CsA (resultados mostrados en el capítulo 1), se estudió el papel de TLR4 en la inflamación y daño progresivo mediante dos estrategias de inhibición del receptor: cotratamiento con el inhibidor farmacológico TAK-242 y supresión génica en ratones knock-out (TLR4^{-/-}). En primer lugar, se analizó la expresión de TLR4 en el tejido renal. En comparación con los ratones del grupo control y de acuerdo a los resultados presentados en la Figura 2, el análisis de los riñones de los ratones tratados con CsA durante 10 días reveló un incremento significativo de la expresión génica de TLR4, así como de su adaptador Myd88, sugiriendo un aumento en la actividad de la señalización por este receptor. Por el contrario, en los ratones tratados con el inhibidor TAK-242, la expresión de ambos marcadores se vio significativamente disminuida (**Figura 7A**). En los ratones tratados con CsA, el aumento de la expresión génica de TLR4 fue acompañado por el incremento de su expresión proteica detectado por inmunofluorescencia en el borde luminal y citoplasma de las células tubulares, así como en los glomérulos (**Figura 7B**). Por el contrario, la expresión de TLR4 inducida por CsA fue suprimida en el grupo de ratones tratados con TAK-242.

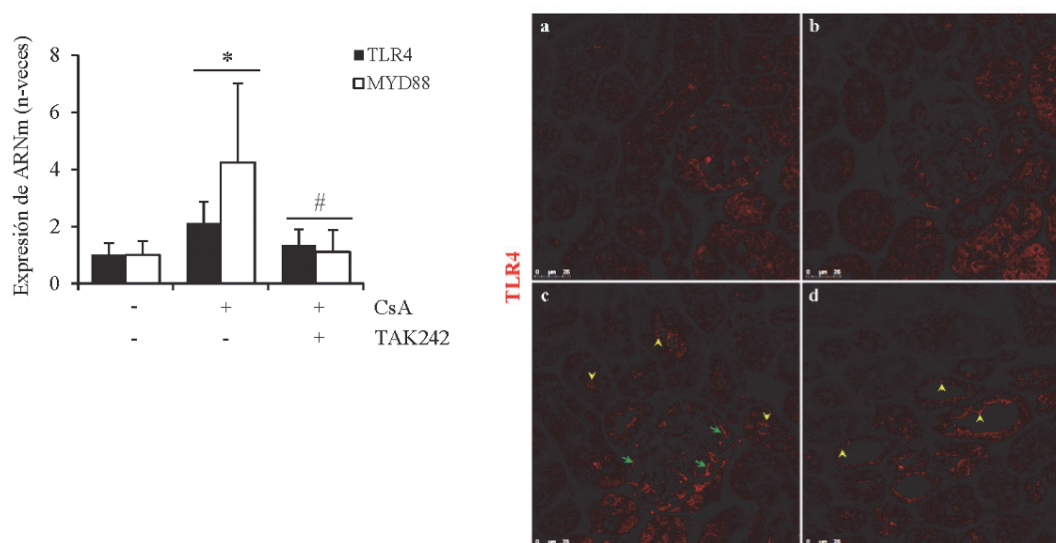


Figura 7. La CsA aumenta la expresión génica y proteica de TLR4 en un modelo *in vivo* de nefrotoxicidad por CsA con inhibición farmacológica con TAK-242. (A) Análisis por PCR de la expresión renal de TLR4 y Myd88 en ratones tratados con CsA o cotratados con CsA y TAK-242 durante 10 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5-8 ratones por grupo. * $p < 0,03$ vs. Control, # $p < 0,03$ vs. CsA. **(B)** Imágenes representativas de la expresión de TLR4 (rojo) por inmunofluorescencia en tejido renal de ratones control (a), tratados con CsA (c,d) y cotratados con TAK-242 (b). Las puntas de flecha indican localización de la marca en el borde luminal y citoplasma tubular. Las flechas muestran marca glomerular. Magnificación original 400x. Barra de escala 25 μ m.

2.2 TLR4 es un mediador de la inflamación renal inducida por CsA

El aumento de la expresión renal de TLR4 observado en ratones tratados con CsA sugirió su posible implicación funcional en la toxicidad renal del inmunosupresor. Con objeto de conocer el papel de TLR4 en los efectos proinflamatorios de CsA, analizamos los riñones de los ratones con inhibición farmacológica o molecular del receptor, en comparación con los riñones del grupo tratado solo con CsA y con los del grupo control sin tratamiento. El bloqueo funcional de TLR4 con TAK-242 o la deficiencia del receptor en ratones TLR4^{-/-} produjo una disminución significativa de los niveles transcripcionales de citoquinas proinflamatorias (MCP-1, Rantes, IL-6 e IP-10); marcadores de activación endotelial (ICAM-1, VCAM-1) y del receptor inflamatorio Fn14 inducidos por CsA (**Figura 8A-B**). De igual modo, el bloqueo con TAK-242 o la deficiencia génica de TLR4 previno notablemente la infiltración renal de macrófagos y linfocitos, destacando la efectividad de ambos métodos de bloqueo del receptor sobre la producción de inflamación (**Figura 8C**).

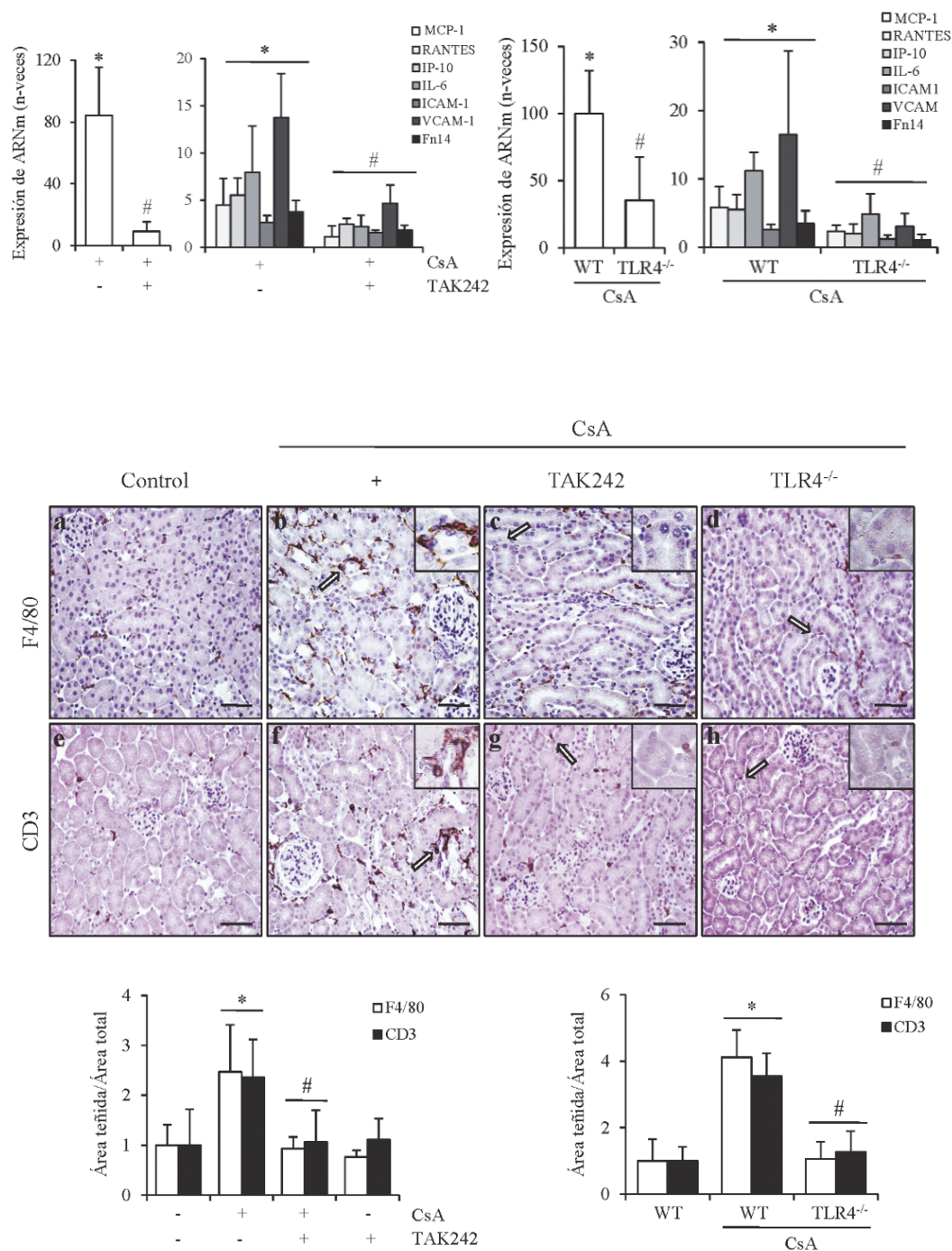
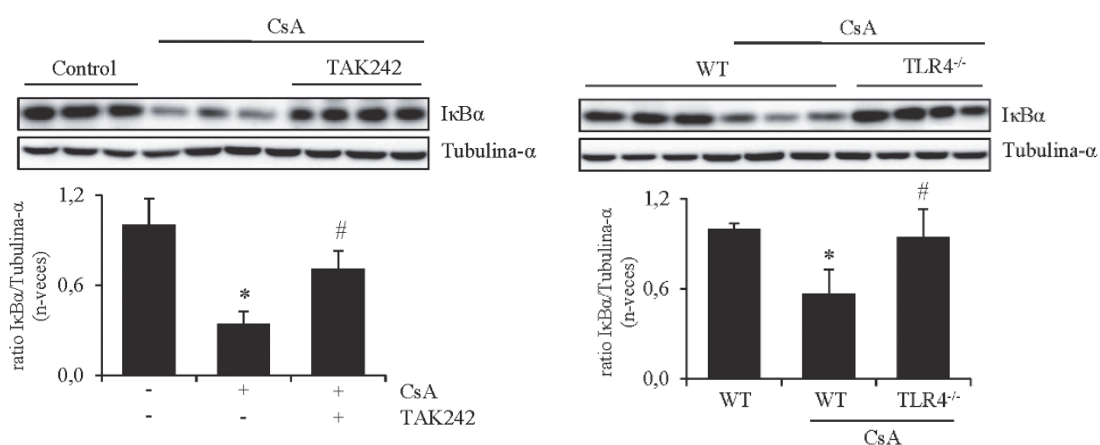


Figura 8. La inhibición farmacológica o deficiencia génica de TLR4 suprimen la expresión génica de mediadores inflamatorios renales, así como la infiltración de células inmunes en un modelo *in vivo* de nefrotoxicidad por CsA. (A-B) Análisis por PCR de la expresión de marcadores inflamatorios en un modelo de bloqueo de TLR4 con TAK-242 (A) y en ratones TLR4^{-/-} (B) tras la administración de CsA durante 10 días, expresados como número de veces incrementado sobre el control (valor del control: 1). (C) Microfotografías representativas de la inmunodetección de macrófagos F4/80⁺ (panel superior) y de células linfocíticas CD3⁺ (panel inferior) en tejido renal de ratones control (a,e), tratados con CsA (b,f), cotratados con TAK-242 (c,g) y TLR4^{-/-} (d,h) durante 10 días. Las flechas indican la localización tubulointersticial de la marca. El panel inferior muestra las cuantificaciones de ambas IHQ. Magnificación original 200x. Barra de escala 100 μ m. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5-8 ratones por grupo. *p<0,01 vs. Control, #p<0,01 vs. CsA.

2.3 Las vías de señalización proinflamatorias activadas por CsA *in vivo* son dependientes de la actividad de TLR4

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que en células tubulares renales, la activación de vías de señalización JAK2/STAT3 y JNK por CsA promueve la expresión de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- κ B (90). Profundizando en estos resultados, estudiamos *in vivo* si estas vías inflamatorias estaban involucradas en la ruta de señalización de TLR4. Mediante ensayos de western blot de proteínas totales, observamos que, en relación a los niveles basales de I κ B α expresados en los riñones del grupo control, en los animales tratados con CsA se inducía una degradación de esta proteína, indicando de este modo la activación de la vía NF- κ B. Por el contrario, la degradación de I κ B α se revirtió tanto en los ratones tratados con TAK-242 (**Figura 9A**) como en los TLR4^{-/-} (**Figura 9B**). Además, en los riñones de los ratones tratados con CsA, detectamos mediante inmunohistoquímica aumentos significativos de la fosforilación/activación de JNK y de su diana natural, el factor de transcripción c-Jun, localizados en el citoplasma y núcleo de las células tubulares, respectivamente (**Figura 9C**). También, observamos translocación nuclear de STAT-3 (**Figura 9C**), sugiriendo activación de la vía JAK2, así como aumento de los niveles de expresión citoplásmicos de Fn14 (**Figura 9C**). De manera destacable, el aumento de actividad y los cambios de expresión o localización celular de estos factores inducidos por CsA en el riñón fueron suprimidos por el tratamiento con TAK-242 o en los ratones TLR4^{-/-} (**Figura 9C**).



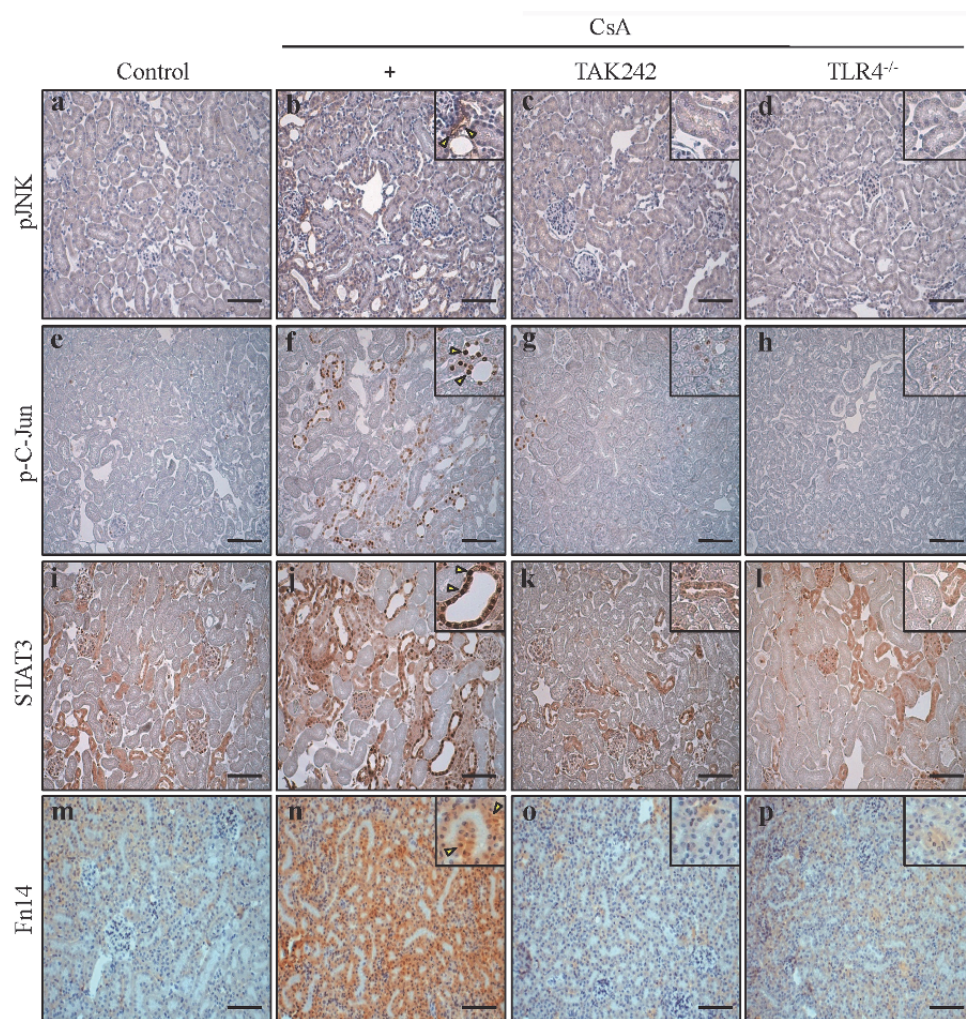


Figura 9. La inhibición farmacológica o génica de TLR4 suprime la activación renal de vías proinflamatorias inducidas por CsA en un modelo *in vivo* de nefrotoxicidad. (A-B) Análisis por western blot de los niveles de expresión de la proteína I κ B α en ratones cotratados con CsA y TAK-242 **(A)** y en ratones TLR4^{-/-} tratados con CsA **(B)** durante 10 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5-8 ratones por grupo. * $p < 0,01$ vs. Control, # $p < 0,01$ vs. CsA. **(C)** Imágenes de IHQ representativas de la detección de las proteínas pJNK, p-C-Jun, STAT3 y FN14 en el tejido renal de ratones control (a,c,i,m), tratados con CsA (b,f,j,n), cotratados con TAK-242 (c,g,k,o) y en ratones TLR4^{-/-} tratados con CsA (d,h,l,p). Las puntas de flecha señalan la localización específica de la marca. Magnificación original 200x. Barra de escala 100 μ m.

2.4 TLR4 participa como mediador de la fibrosis renal inducida por CsA

Tomados en su conjunto los resultados mostrados en los capítulos 2.2 y 2.3 evidenciaron que TLR4 es un importante mediador de la inflamación renal inducida por CsA en el organismo vivo. Para determinar si TLR4 era también un factor clave en la producción de lesiones crónicas, se evaluó el efecto de la supresión farmacológica y molecular de TLR4 sobre la generación de fibrosis. Los ratones tratados con CsA durante 10 y 20 días mostraron un aumento progresivo de los niveles transcripcionales de COL-1, FN-1, PAI-1 y TGF β (**Figura 10A-B**). En contraste, la expresión génica de estos factores fue inhibida en los ratones tratados con TAK-242 (**Figura 10A**), así como en los ratones TLR4^{-/-} (**Figura 10B**). Asimismo, la inhibición de TLR4 previno totalmente la fibrosis provocada por la CsA en los ratones tratados durante 20 días (**Figura 10C**).

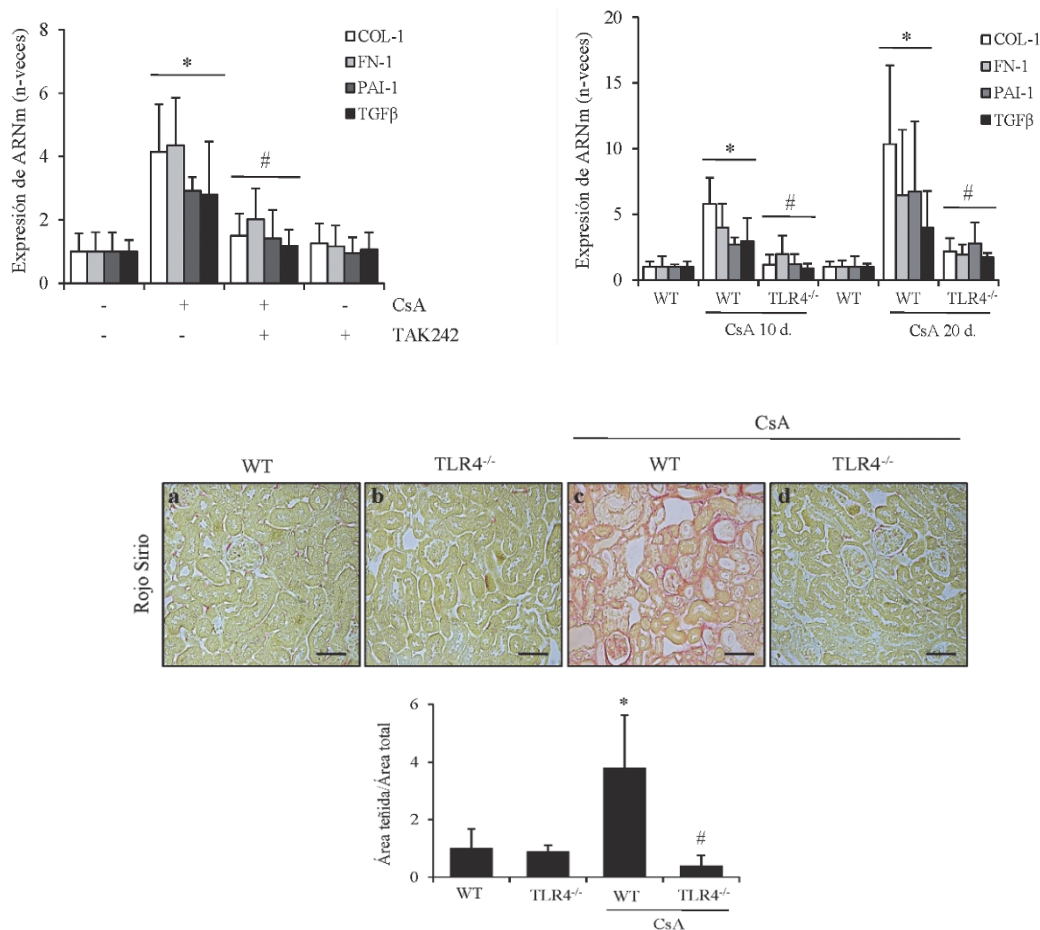


Figura 10. La inhibición farmacológica o génica de TLR4 suprime la expresión renal de genes profibróticos y la formación de depósitos de colágeno intersticial en un modelo *in vivo* de nefrotoxicidad por CsA. (A) Análisis por PCR de la expresión renal de marcadores profibróticos en ratones cotratados con CsA y TAK-242 durante 10 días **(A)** y TLR4^{-/-} tratados con CsA durante 10 y 20 días **(B)**. **(C)** Microfotografías representativas de la tinción de rojo sirio en tejido renal de ratones control wt (a), control TLR4^{-/-} (b), wt tratados con CsA (c) y TLR4^{-/-} tratados con CsA (d) durante 20 días. En rojo se muestran los depósitos de colágeno intersticial y su cuantificación en el panel inferior. Magnificación original 200x. Barra de escala 100 μ m. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5-8 ratones por grupo. * $p < 0,01$ vs. Control, # $p < 0,01$ vs. CsA.

Con el fin de conocer si los efectos preventivos de la inhibición de TLR4 sobre la aparición de la fibrosis podían ser atribuidos a acciones directas del receptor sobre mecanismos intrínsecos de la fibrosis, se estudió la participación de TLR4 en la respuesta profibrótica inducida por CsA en fibroblastos renales cultivados. Se observó que la estimulación de los fibroblastos murinos NRK-49F con CsA no incrementó los niveles proteicos basales de COL-1 y FN-1 secretados al medio extracelular (**Figura 11A**). Sin embargo, la CsA fue capaz de inducir aumentos transcripcionales significativos de PAI-1, factor clave en el mantenimiento de la respuesta fibrótica renal, aunque de manera independiente al bloqueo funcional de TLR4 con TAK-242 (**Figura 11B**). Por el contrario, TAK-242 previno la inducción de MCP-1 mediada por CsA (**Figura 11C**). Así, estos resultados sugerían que *in vivo*, la señalización por TLR4 podría ser más relevante en la mediación de las respuestas proinflamatorias desencadenadas por CsA que de manera directa sobre la propia respuesta fibrótica. Del mismo modo, el conjunto de estos resultados sugería que la inflamación es un evento clave en la progresión de nefrotoxicidad por CsA, y que su bloqueo mediante inhibición de la señalización por TLR4 inhibe o retrasa significativamente la aparición de la fibrosis.

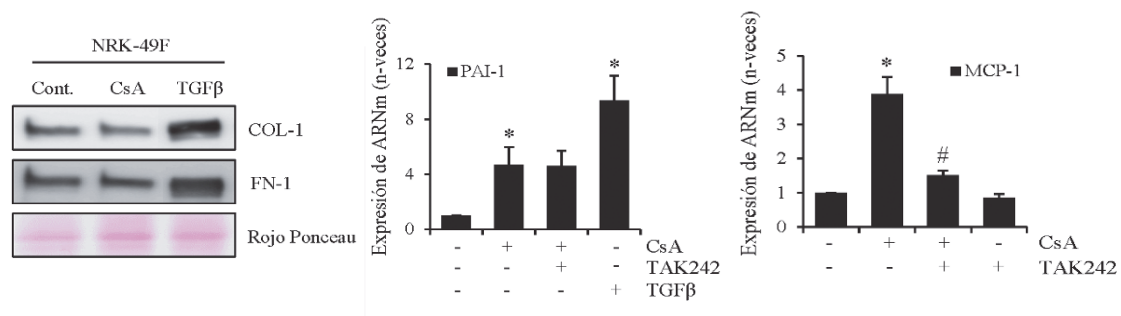
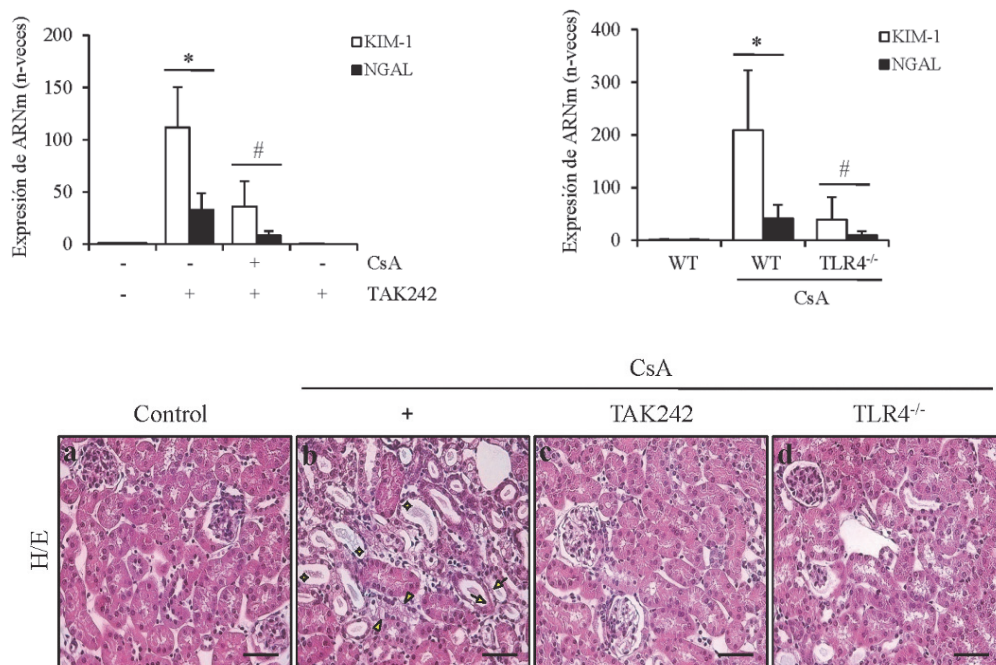


Figura 11. La señalización por TLR4 media respuestas inflamatorias, pero no participa directamente sobre respuestas fibróticas inducidas por CsA en cultivo de fibroblastos renales. (A) Western blot de colágeno 1 (COL-1) y fibronectina (FN-1) realizado con sobrenadantes de fibroblastos renales murinos NRK-49F estimulados con CsA (2,5 µg/ml) durante 48 horas. (B-C) Análisis por PCR de marcadores de fibrosis (PAI-1) e inflamación (MCP-1) a partir de células pretratadas durante 6 horas con el inhibidor farmacológico de TLR4, TAK-242 (10µM) y estimuladas con CsA durante 24 y 6 horas, respectivamente. TGFβ (10 ng/ml) fue usado como control positivo. Los datos se expresan como la media ± EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto al basal. *p<0,05vs. Control, #p<0,05vs. CsA.

2.5 La inhibición de TLR4 atenúa el daño tubular y la pérdida de función renal producida por CsA

Los efectos patológicos derivados del tratamiento con CsA resultan en daño tubulointersticial y la consecuente pérdida de función renal. El análisis de estos parámetros en nuestros modelos, evidenció que la CsA produjo un daño inicial sobre las células tubulares, detectado a través de la expresión génica de KIM-1 y NGAL, concomitante al incremento de expresión de citoquinas proinflamatorias (**Figura 12A-B**). De este modo, los ratones tratados con CsA durante 10 días mostraron un marcado aumento de los niveles transcripcionales de KIM-1 y NGAL, respecto a la expresión basal de los controles, proceso que se vio revertido en los ratones cotratados con TAK-242 (**Figura 12A**) y en aquellos defectivos para la expresión de TLR4 (**Figura 12B**). Además, el bloqueo farmacológico y molecular de TLR4 protegió a los ratones tratados con CsA durante 10 y 20 días frente al daño tubular progresivo, caracterizado por dilatación tubular, necrosis y atrofia tubular, formación de depósitos intraluminales y vacuolización citoplásmica de las células tubulares, observados mediante tinción de hematoxilina/eosina (**Figura 12C**). Finalmente, la inhibición de TLR4 evidenció una mejora de la función renal, previniendo el aumento de los niveles plasmáticos de urea observados en los ratones tratados con CsA (**Figura 12D-E**).



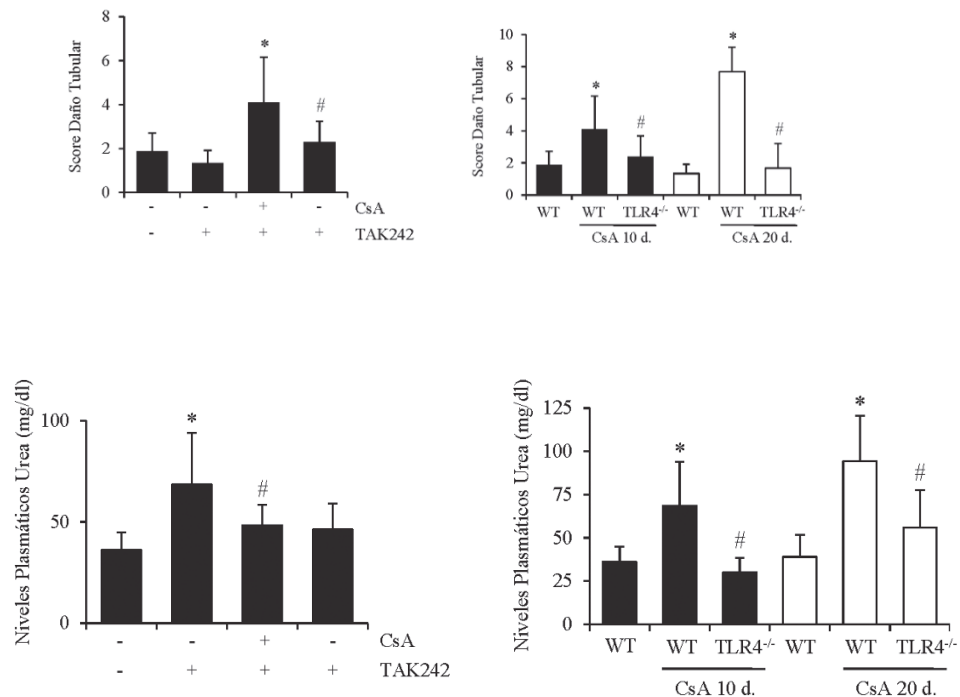


Figura 12. La supresión farmacológica o génica de TLR4 previene el daño tubulointersticial y mejora la función renal en un modelo *in vivo* de nefrotoxicidad por CsA. (A-B) Análisis por PCR de la expresión renal de marcadores de daño tubular (KIM-1, NGAL) en ratones cotratados con CsA y TAK-242 durante 10 días **(A)** y en ratones TLR4^{-/-} tratados con CsA 10 y 20 durante días **(B)**. **(C)** Fotografías representativas de la estructura renal en cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina provenientes de ratones control (a), tratados con CsA (b), cotratados con TAK-242 (c) y TLR4^{-/-} (d). Las flechas señalan dilatación y atrofia tubular, las puntas de flecha vacuolización tubular y los diamantes los depósitos hialinos intraluminales. Los gráficos de barras muestran la cuantificación histopatológica del daño tubular mediante un “score” sumatorio de daño con puntaje asignado (escala 0-3) para cada tipo de lesión. **(D-E)** Determinación de los niveles plasmáticos de urea en ratones cotratados con CsA y TAK-242 por 10 días **(D)** y TLR4^{-/-} tratados con CsA por 10 y 20 días **(E)**. Magnificación original 200x. Barra de escala 100 μ m. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5-8 ratones por grupo. * $p < 0,02$ vs. Control, # $p < 0,02$ vs. CsA.

2.6 En células tubulares en cultivo y en el riñón *in vivo*, CsA moviliza HMGB1 de manera no dependiente de TLR4

HMGB1 es una proteína inflamatoria que se encuentra normalmente unida a la cromatina nuclear. HMGB1 puede ser secretada al espacio extracelular de forma pasiva o activa a partir de células necróticas o apoptóticas o en respuesta a condiciones de estrés en el riñón. En todos los casos, HMGB1 puede ejercer un papel importante como ligando endógeno de TLR4 (91,92). Dado que HMGB1 es un importante mediador del daño renal, estudiamos el tránsito intracelular *in situ* de esta proteína en el tejido renal de ratones sometidos al tratamiento con CsA. Comparado con los ratones control, aquellos tratados con CsA no exhibieron cambios relevantes en la expresión génica de HMGB1 en el riñón **(Figura 13A)**.

Sin embargo, en los ratones tratados con CsA a 10 días, el estudio inmunohistoquímico demostró una marcada pérdida del contenido nuclear de HMGB1 en las células tubulares (**Figura 13B**). Acorde con este resultado, se detectó mediante western blot un aumento en los niveles citoplásmicos de HMGB1 (**Figura 13C**). Por otro lado, el tratamiento con TAK-242 no previno ni la exportación nuclear (**Figura 13B**) ni el incremento de los niveles citoplásmicos de la proteína (**Figura 13C**), sugiriendo que los cambios en la localización intracelular de HMGB1 inducidos por CsA podrían ser regulados de forma independiente a la activación de TLR4.

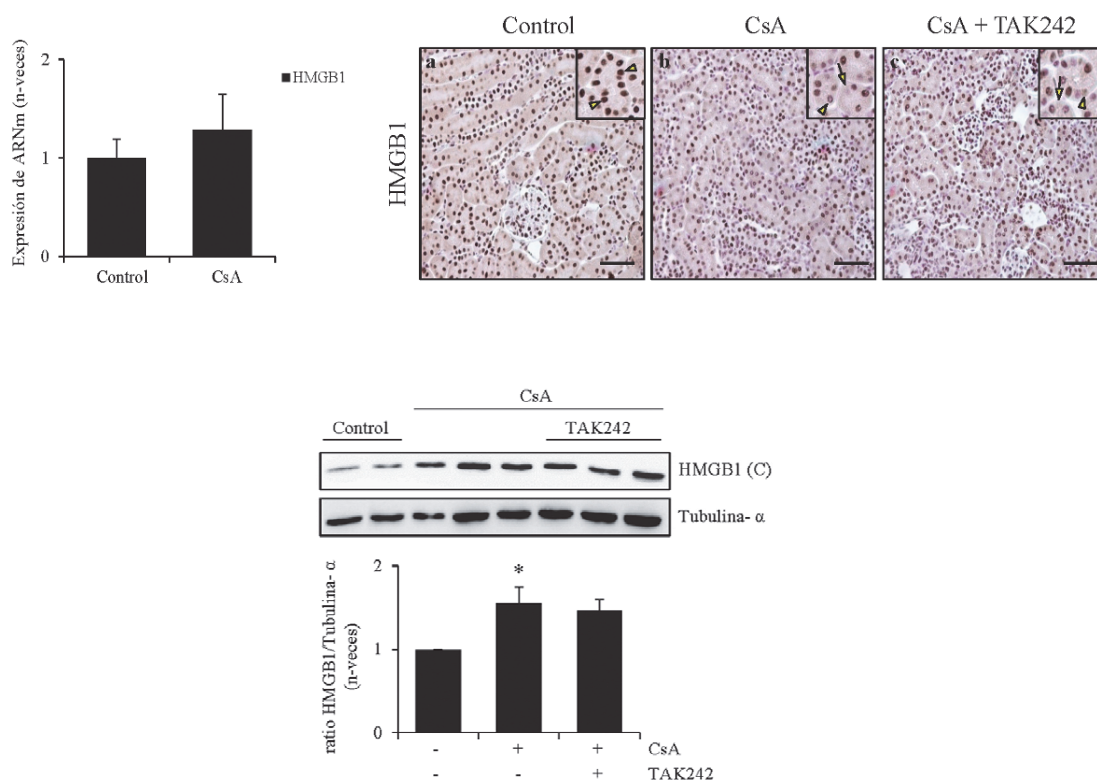


Figura 13. La CsA promueve en las células tubulares el tránsito núcleo-citoplasma de HMGB1 sin participación de TLR4. (A) Análisis por PCR de la expresión renal de HMGB1 en ratones tratados con CsA 10 durante días. **(B)** Microfotografías representativas de la inmunodetección de HMGB1 en tejido renal de ratones control (a), tratados con CsA 10 días (b) y cotratados con TAK-242 (c). Las flechas amarillas indican la localización nuclear de la marca. **(C)** Western blot representativo de proteínas citosólicas de riñón de ratones tratados con CsA y cotratados con TAK-242 durante 10 días. Magnificación original 200x. Barra de escala 100 μ m. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5-8 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control.

Los resultados *in vivo* sugirieron que la CsA podría actuar como inductor de la liberación temprana de HMGB1, y por lo tanto ser un activador de la señalización por TLR4. Estudios *in vitro* realizados sobre células tubulares renales MCT confirmaron que HMGB1 se localizaba en el núcleo de células control sin tratamiento, mientras que se detectaba en la fracción citoplásmica de las células tratadas con CsA, hecho coincidente con un descenso del contenido nuclear.

Además, HMGB1 fue detectada como producto de secreción en los sobrenadantes de las células tratadas con CsA, pero no en los controles sin tratar (**Figura 14A**). Por otra parte, las células pretratadas con el inhibidor de apoptosis z-VAD-fmk y estimuladas con CsA, no mostraron una disminución en los niveles secretados de HMGB1, lo cual implica la ausencia de liberación activa de HMGB1 en procesos de apoptosis (**Figura 14A**). Además, observamos que el tratamiento con TAK-242 en células estimuladas con CsA no impide la secreción de HMGB1, demostrando que la activación de TLR4 no es un requisito para la secreción del ligando (**Figura 14B**). Acorde con este último resultado, la activación de TLR4 por su ligando específico LPS, tampoco promovió la liberación de HMGB1 (**Figura 14B**). Por último, cabe destacar que el bloqueo funcional de la transición núcleo-citoplasma de HMGB1 por el inhibidor farmacológico Glicirricina, resultó en una reducción significativa de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias inducidas por CsA (**Figura 14C**). De forma global, los resultados sugieren que en el riñón *in vivo* la CsA induce un rápido tránsito nucleocitoplásmico y posterior secreción de HMGB1 en las células tubulares, y en consecuencia el inicio de la respuesta de TLR4.

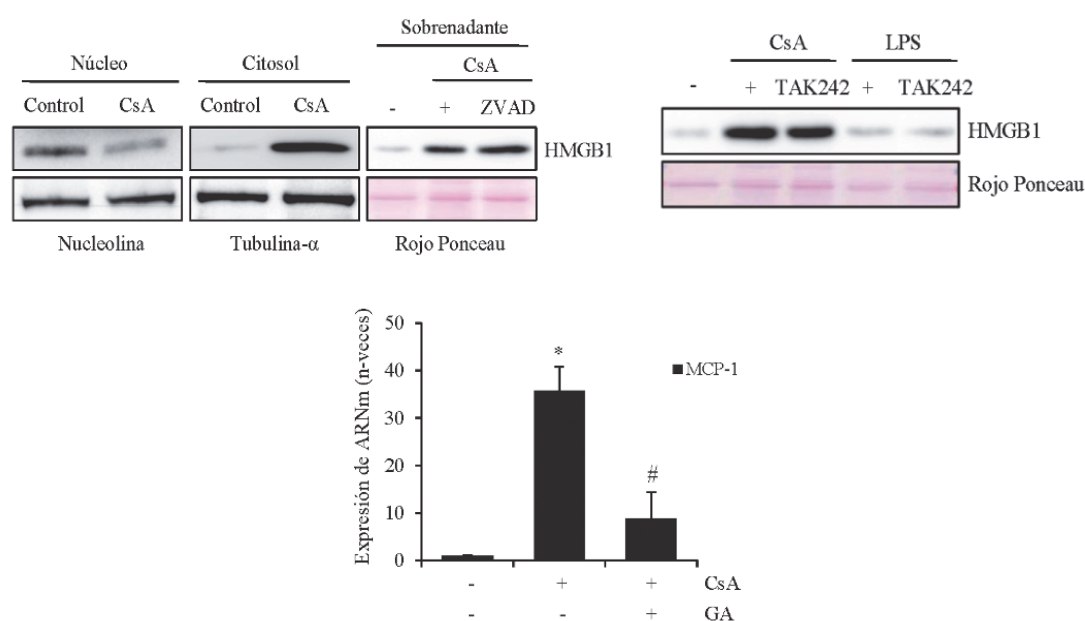


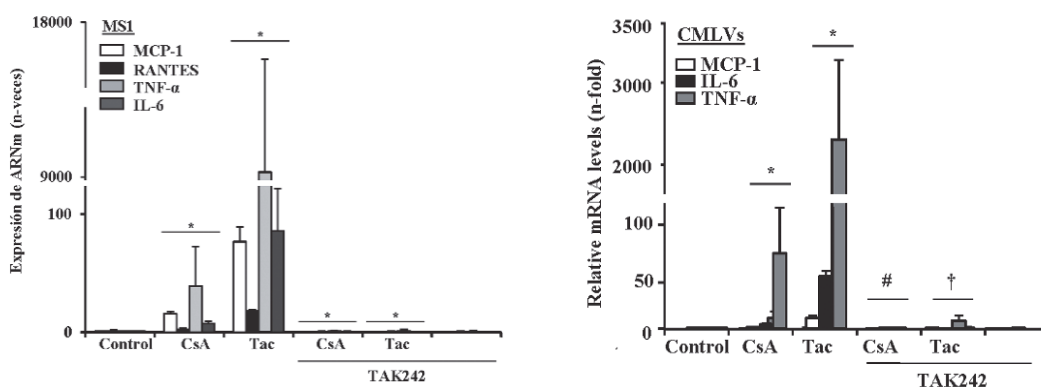
Figura 14. La CsA promueve el tránsito intracelular y secreción de HMGB1 en células tubulares de manera previa a la activación de TLR4. (A) Western blot de HMGB1 a partir de proteínas de los sobrenadantes de cultivos de células tubulares MCT tratadas durante 24 horas con CsA (10 μ g/ml) o pretratadas con zVAD-fmk (25 μ M) y estimuladas con CsA durante 24 horas. Se demuestra que la inhibición de la apoptosis no interfiere en la secreción de HMGB1 inducida por CsA. **(B)** Western blot de sobrenadantes de células pretratadas con TAK-242 (10 μ M) durante 6 horas y estimuladas con CsA o LPS (1 μ g/ml) durante 24 horas. Se demuestra que la secreción de HMGB1 es independiente de TLR4. **(C)** Análisis por PCR de la expresión de MCP-1 en células tratadas con CsA durante 6 horas en presencia o ausencia de Glicirricina (1mM) (GA). Se demuestra que el bloqueo del tránsito núcleo-citoplasma de HMGB1 inhibe los efectos proinflamatorios inducidos por CsA. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto al basal. * $p < 0,05$ vs. Control, # $p < 0,05$ vs. CsA.

3. PAPEL DE TLR4 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA ENDOTELIAL Y VASCULAR INDUCIDA CsA Y TAC

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que los ACNs inducen la activación de células endoteliales (Ocaña C, tesis doctoral). Además, resultados de esta tesis demuestran que TLR4 es un mediador de la inflamación renal producida por CsA (mostrados en el capítulo 2). Considerando estos antecedentes, así como la potencial relevancia del receptor TLR4 en la patología vascular humana (24,93) hipotetizamos que este receptor podría ser también un mediador de los efectos proinflamatorios de los ACNs en las células de la pared vascular.

3.1 TLR4 actúa como mediador de la inflamación inducida por los ACNs en células endoteliales y vasculares *in vitro*

Con el fin de evaluar el papel de TLR4 en la inflamación endotelial y vascular, se trataron células endoteliales microvasculares MS1 y de músculo liso vascular CMLVs con CsA y Tac durante 6 horas, lo que resultó en un aumento de la respuesta génica de MCP-1, Rantes, TNF- α e IL-6. El bloqueo de TLR4 mediante el pretratamiento de las células con TAK-242 suprimió este efecto (**Figura 15A-B**). Además, en las células MS1, el tratamiento con TAK-242 previno la activación endotelial disminuyendo los niveles transcripcionales de ICAM-1, VCAM-1 y SELE inducidos por CsA (**Figura 15C**).



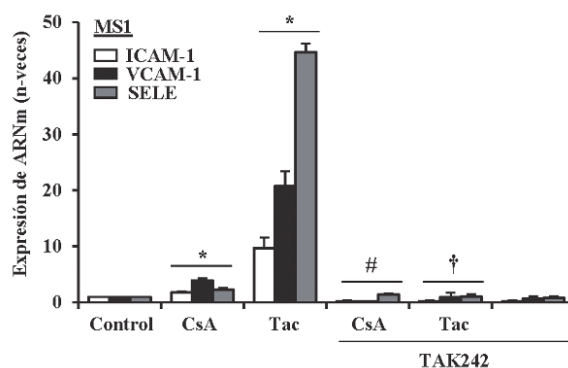
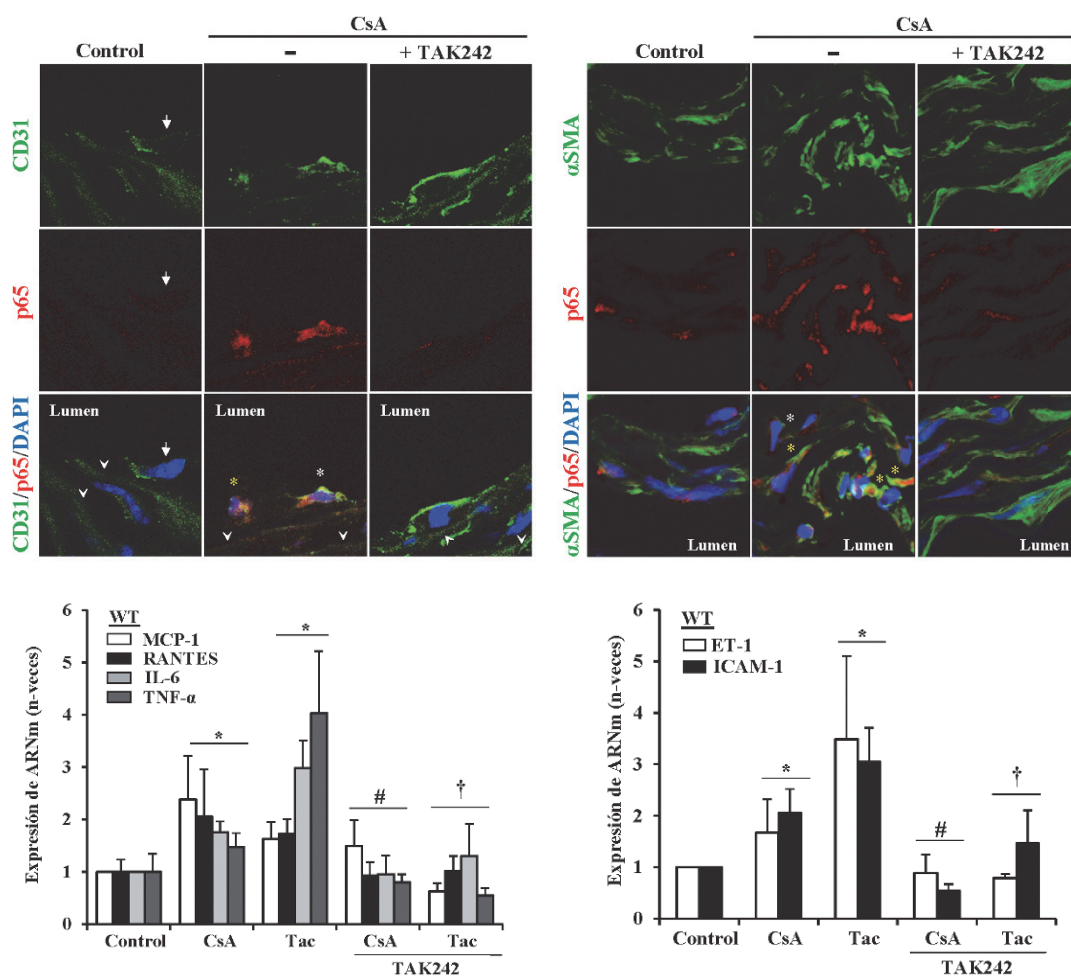


Figura 15. La inhibición farmacológica de TLR4 suprime la expresión génica de mediadores inflamatorios inducidos por CsA y TAC en células endoteliales y vasculares. (A-B) Análisis por PCR de marcadores inflamatorios en células MS1 (A) y CMLVs (B) pretratadas 6 horas con TAK-242 (10 μ M) y posteriormente estimuladas con CsA (10 μ g/ml) y Tac (20 μ g/ml) durante 6 horas. (C) Análisis por PCR de marcadores de activación endotelial en células MS1 pretratadas 6 horas con TAK-242 y estimuladas con CsA y Tac durante 6 horas. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la expresión basal en células control sin tratamiento. * $p < 0,05$ vs. Control, # $p < 0,05$ vs. CsA, † $p < 0,05$ vs. Tac.

3.2 TLR4 actúa como mediador de la inflamación inducida por los ACNs en cultivos *ex vivo* de aortas de ratón

Aunque se sabe que los ACNs promueven alteraciones de la homeostasis vascular causando disfunción endotelial, aumento de los depósitos de matriz extracelular e hipertensión (94,95), sus posibles efectos proinflamatorios y mecanismos que los regulan son prácticamente desconocidos. Para profundizar en el estudio de los posibles efectos inflamatorios de los ACNs en la vasculatura, se diseñó un modelo experimental de toxicidad vascular por ACNs a partir de cultivos *ex vivo* de secciones de tejido aórtico de ratón. El cultivo de los segmentos aórticos tratados con CsA exhibió un aumento de expresión y translocación nuclear de p65/NF- κ B, tanto en células endoteliales como en células de músculo liso vascular, identificadas mediante inmunofluorescencia de los marcadores específicos CD31 y de α -SMA, respectivamente (**Figura 16A**). Por otra parte, los tratamientos con CsA y Tac incrementaron la expresión de citoquinas proinflamatorias relacionadas con el daño vascular y reguladas por NF- κ B como MCP-1, Rantes, IL-6 y TNF- α (**Figura 16B**). Además, los ACNs también aumentaron los niveles transcripcionales del marcador de activación endotelial ICAM-1 y de disfunción endotelial ET-1 (**Figura 16C**). Para investigar la dependencia de estos efectos proinflamatorios con TLR4, las secciones aórticas fueron pretratadas con TAK-242 y posteriormente estimuladas con CsA y Tac. El bloqueo farmacológico de TLR4 previno la activación de la vía NF- κ B, y en consecuencia el aumento de la expresión de genes proinflamatorios y de disfunción endotelial promovida por los ACNs (**Figura 16B-C**).

Con el objetivo de reforzar estos resultados, se estudiaron los efectos proinflamatorios de los ACNs en cultivos *ex vivo* de aortas procedentes de ratones TLR4^{-/-}. Así, los tratamientos con CsA y Tac no indujeron cambios en la expresión génica de MCP-1, IL-6, ICAM-1 o ET-1, confirmando que TLR4 es un mediador principal de las respuestas patológicas vasculares inducidas por los ACNs. Cabe destacar que la estimulación de las aortas con TNF- α resultó en incrementos de los niveles transcripcionales de MCP-1, IL-6, ICAM-1 y ET-1 independiente de la deficiencia de TLR4. Estos resultados refuerzan el concepto de que la disminución de la respuesta inflamatoria inducida por CsA es específica de la ausencia de expresión de TLR4 (**Figura 16D**). El análisis de los resultados obtenidos en el tejido aórtico demostró que las respuestas proinflamatorias inducidas por los ACNs son reguladas mediante señalización por TLR4, no solo en el epitelio tubular renal, sino también en los tipos celulares más relevantes de la pared vascular. Estos resultados refuerzan la idea de que los efectos proinflamatorios de los ACNs en la vasculatura pueden contribuir como un factor independiente de la patogenia del daño vascular sistémico y renal asociado al trasplante.



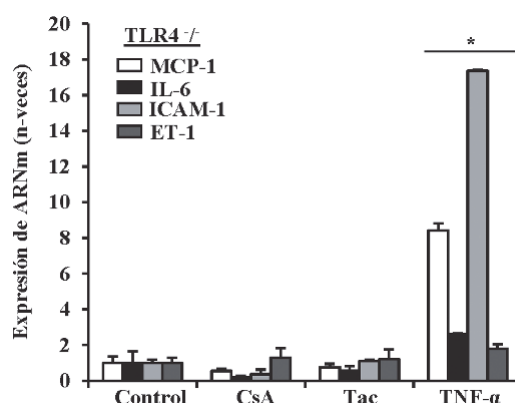


Figura 16. El bloqueo farmacológico o génico de TLR4 inhibe la activación de la ruta NF-κB, así como la expresión de factores inflamatorios inducidos por los ACNs en cultivo *ex vivo* de aortas murinas. **(A)** Imágenes representativas de la activación de NF-κB detectada mediante aumentos de expresión o translocación nuclear de p65 (fluorescencia roja) en células endoteliales y vasculares identificadas mediante inmunofluorescencia de CD31 (fluorescencia verde, panel izquierdo) y de α-SMA (fluorescencia verde, panel derecho), respectivamente, en tejido aórtico de ratones wt control, tratados con CsA y cotratados con CsA y TAK-242. Los asteriscos muestran células con activación de p65 y marca positiva de CD31 o α-SMA. **(B-C)** Análisis por PCR de marcadores inflamatorios **(B)** y de respuesta endotelial **(C)** en segmentos aórticos de ratones wt pretratados con TAK-242 (10μM) y estimulados con CsA (10μg/ml) y Tac (20μg/ml) durante 6 horas. **(D)** Análisis por PCR de marcadores inflamatorios y de respuesta endotelial en segmentos aórticos de ratones TLR4^{-/-} estimulados con CsA (10μg/ml) y Tac (20μg/ml) durante 6 horas. El estímulo TNF-α (30ng/ml) fue usado como control positivo de actividad inflamatoria independiente de la señalización por TLR4. Magnificación original 630x. Los datos se expresan como la media ± EEM de 3 experimentos independientes normalizados respecto al basal. *p<0,05 vs. Control, #p<0,05 vs. CsA, †p<0,05 vs. Tac.

3.3 La inducción de inflamación por ACNs en aorta está ligada a la producción de ROS formados por activación de TLR4

El estrés oxidativo es un mediador principal de la inflamación en la patología vascular por lo que quisimos evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un cultivo *ex vivo* de aortas de ratón sometidas al tratamiento con ACNs de forma aislada o bien expuestas a un pretratamiento con TAK-242. Comparadas con las aortas control no tratadas, aquellas estimuladas con CsA mostraron un incremento en la producción de O₂⁻/ROS detectado mediante la sonda fluorescente DHE en las células vasculares de músculo liso y también en células endoteliales. Por el contrario, el pretratamiento con TAK-242 previno la producción de ROS, demostrando que la activación de TLR4 regula la producción de O₂⁻/ROS (**Figura 17A**). Para precisar la contribución de TLR4 en la producción de ROS mediada por los ACNs en el proceso inflamatorio vascular global, se realizaron experimentos sobre células endoteliales MS1 reproduciendo los mismos tratamientos desarrollados en la experimentación *ex vivo*.

De esta forma, la inhibición farmacológica de TLR4 reprimió la producción de O_2^- /ROS, analizado por tinción DHE (**Figura 17B**). Además, la utilización de los inhibidores de la NADPH oxidasa, apocinina y DPI, atenuaron el incremento de los niveles transcripcionales de MCP-1, Rantes, ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por CsA y Tac (**Figura 17C**). En conjunto, estos resultados señalan la participación del estrés oxidativo y la producción de O_2^- /ROS como mediadores de la inflamación vascular inducida por ACNs, así como la dependencia de su producción con la activación de TLR4.

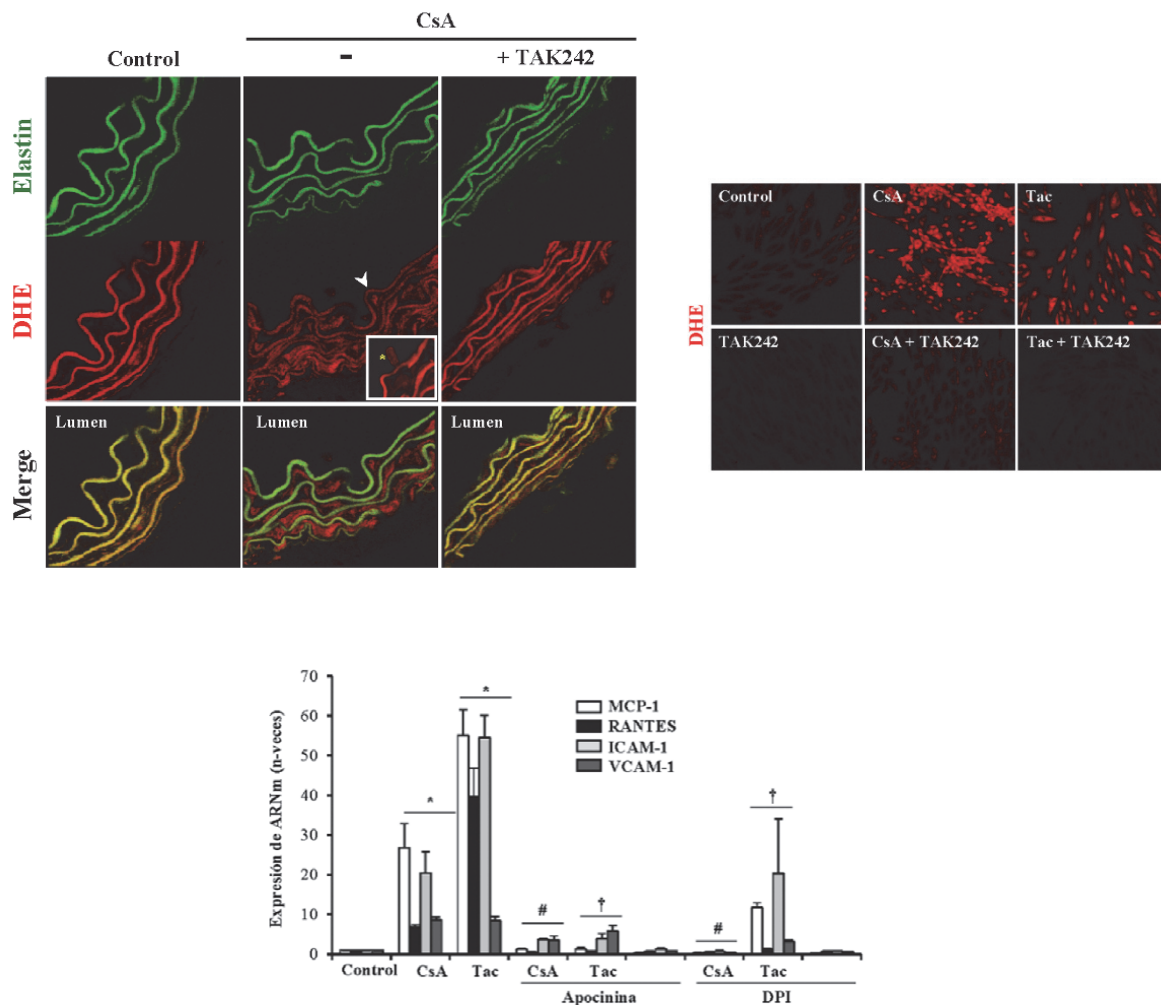


Figura 17. La inhibición farmacológica de TLR4 previno la producción de O_2^- /ROS por ACNs en segmentos aórticos murinos *ex vivo* y en células endoteliales *in vitro*. (A) Microfotografías representativas de la fluorescencia emitida por la sonda DHE (rojo) en secciones aórticas pretratadas 6 horas con TAK-242 y estimuladas con CsA 3 horas. La flecha blanca señala una célula de músculo liso vascular positiva para DHE, mientras que el asterisco en el cuadro de mayor aumento muestra una célula endotelial con marca positiva. En verde se distingue la autofluorescencia emitida por las fibras de elastina. (B) Imágenes representativas de la fluorescencia emitida por la sonda DHE en células MS1 tratadas con CsA y Tac o pretratadas con TAK-242 antes de la estimulación con los ACNs. (C) Análisis por PCR de marcadores inflamatorios y de activación endotelial en células MS1 tratadas individualmente con CsA y Tac o pretratadas con los inhibidores de la NADPH, Apocinina (10mM) y DPI (10 μ M) y estimuladas con los ACNs por 6 horas. Magnificación original 400x. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes normalizados respecto al basal. * $p < 0,05$ vs. Control, # $p < 0,05$ vs. CsA, † $p < 0,05$ vs. Tac.

4. PAPEL DE LA RESPUESTA UPR LIGADA A ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA REGULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR CSA Y TAC

4.1 Análisis transcriptómico de la respuesta UPR inducida por CsA y Tac en células tubulares murinas

La respuesta de estrés del retículo endoplásmico, y particularmente la respuesta UPR, son crecientemente reconocidas como importantes reguladores del daño y la inflamación en la enfermedad renal experimental (84). Con el objetivo de evaluar el potencial efecto de los ACNs para iniciar respuestas proinflamatorias en células tubulares renales e identificar genes de la UPR que pudieran contribuir a este fenómeno, se realizó un array de expresión génica a partir de células tubulares MCT estimuladas con CsA o Tac. Entre los genes con regulación positiva a las 6 horas de inicio del tratamiento, el análisis transcriptómico mostró un aumento significativo en genes de UPR, fundamentalmente aquellos involucrados en la vía PERK (GADD34, CHOP, ATF4, ATF3) y ATF6, aunque no evidenció cambios de expresión en genes dependientes de la vía IRE1/XBP1. Otros genes relacionados con UPR (TRIB3, Herpud1) también incrementaron sus niveles transcripcionales, evidenciando una activación general de respuestas asociadas al estrés del retículo endoplásmico (**Tabla 6**). La regulación positiva de algunos de estos genes de la UPR detectados en el array de células tubulares, como ATF4, CHOP y ATF3, se corroboró en los riñones de los ratones tratados con CsA durante 5, 10 y 20 días (resultados mostrados en el capítulo 1). De este modo, la inducción por ACNs de genes de la UPR en células y tejido renal nos permitió estudiar en profundidad el papel de la UPR en la regulación de la respuesta inflamatoria renal por ACNs.

Función del gen/categoría	Símbolo del gen	CsA ^a	FDR CsA ^b	TAC ^a	FDR TAC ^b
Estrés de Retículo endoplásmico/ Respuesta UPR	<i>Ppp1r15a/GADD34</i>	5,0	<0,001	6,1	<0,001
	<i>Atf3</i>	5,1	<0,001	5,1	<0,001
	<i>Ddit3/CHOP</i>	4,8	<0,001	6,1	<0,001
	<i>Trib3</i>	4,2	0,001	5,0	0,001
	<i>Hmox1</i>	2,9	0,0015	3,5	0,006
	<i>Atf6</i>	2,4	<0,001	2,5	<0,001
	<i>Phlda1</i>	2,3	0,004	1,6	0,036
	<i>Ero1l</i>	1,7	0,0023	2,0	0,004
	<i>Atf4</i>	1,6	0,006	1,6	0,006
	<i>Herpud1</i>	1,8	0,008	1,6	0,0015

Tabla 6. Análisis transcriptómico de células tubulares en cultivo estimuladas 6 horas con CsA o Tac. Se muestra un listado de genes relacionados con estrés del retículo endoplásmico y respuestas asociadas

^a Tasa de expresión de genes relativa al control (n veces)

^b FDR (False Discovery Rate) en valores de p normalizados

4.2 Los inhibidores de calcineurina CsA y Tac activan NF-κB a través de la respuesta UPR

Los resultados del análisis transcriptómico fueron confirmados mediante PCR cuantitativa a partir de nuevos experimentos en células MCT tratadas con CsA y Tac en idénticas condiciones que en los ensayos de array, observándose un aumento de la expresión génica de ATF3, ATF4, ATF6 y CHOP comparado con las células sin tratar (**Figura 18A**). A pesar de que inicialmente no se observaron cambios en la regulación transcripcional de los componentes de la vía IRE1/XBP1, estudios de western blot revelaron aumentos de los niveles de la forma fosforilada de la proteína IRE1α, indicativo de su activación (**Figura 18B**). Asimismo, en los tratamientos con CsA y Tac también se detectó por western blot la forma procesada de XBP1 (“spliced” XBP1/sXBP1), proteína diana de IRE1, y su translocación nuclear mediante inmunofluorescencia (**Figura 18C**). Estos resultados evidenciaron la capacidad de los ACNs para inducir la expresión o activar un amplio espectro de proteínas relacionadas con la UPR.

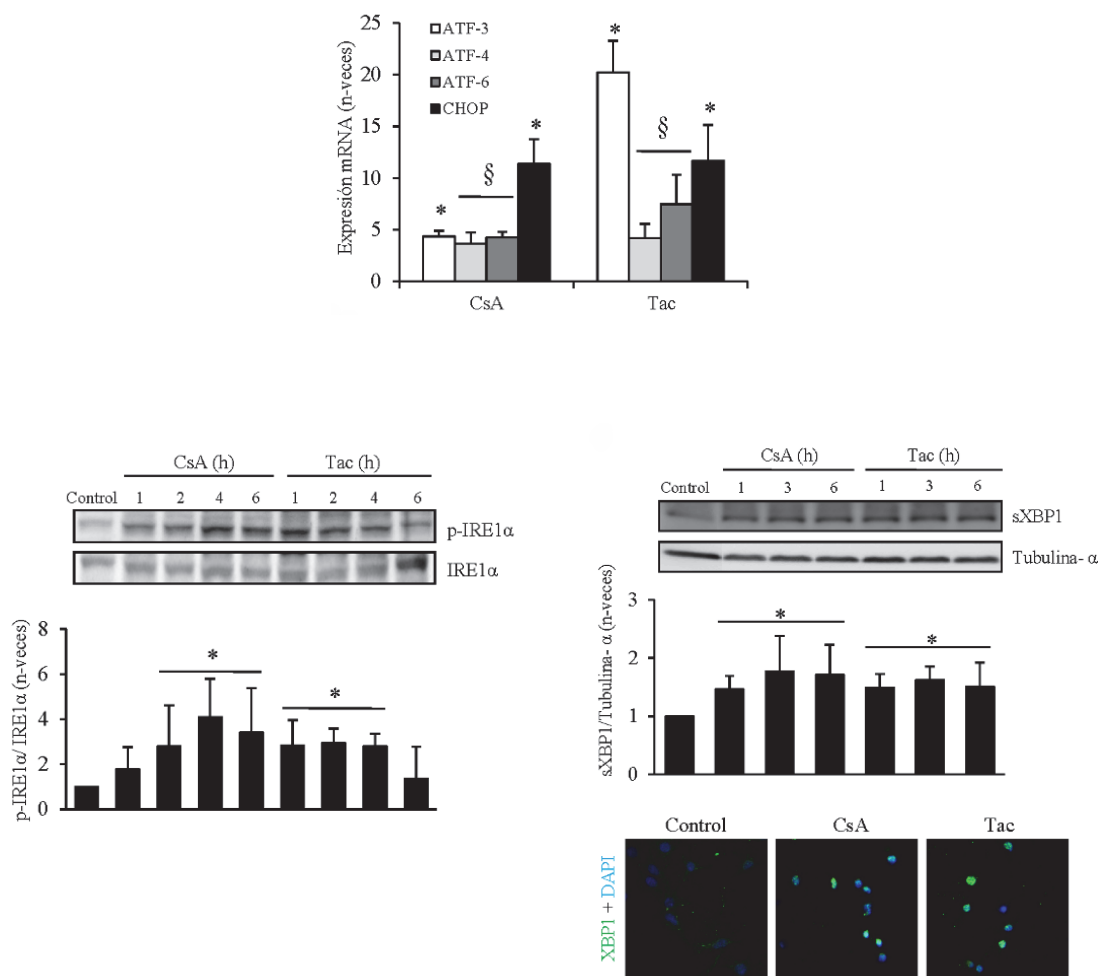


Figura 18. Los ACNs incrementan la expresión génica y proteica de marcadores de activación de UPR en células tubulares. (A) Análisis por PCR de marcadores relacionados con la vía PERK en células MCT tratadas con CsA (10µg/ml) y Tac (20µg/ml) durante 6 horas, expresados como número de veces incrementado sobre el control (valor del control: 1). (B-C) Western blot de la isoforma fosforilada de IRE1 (p-IRE1α) que indica activación de esta proteína (B) y de la forma procesada ("spliced") de XBP1 (XBP1s) (C) en células MCT tratadas con CsA y Tac en tiempos de 1-6 horas. Además, en el panel inferior de la figura C se muestran imágenes representativas de la translocación nuclear de XBP1 en células MCT tratadas con CsA y Tac durante 3 horas mediante inmunofluorescencia (verde). Los datos se expresan como la media ± EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto al basal. *p<0,05 vs. Control, §p<0,02 vs. Control.

Para explorar el papel de la UPR en las respuestas proinflamatorias inducidas por los ACNs, se pretrataron células tubulares MCT con el inhibidor específico de la UPR, el Ácido 4-Fenilbutírico (PBA), y posteriormente fueron estimuladas con CsA y Tac. Las células incubadas con PBA mostraron una rápida inhibición tanto de la translocación nuclear de p65 inducida por CsA y Tac (Figura 19A), como de la expresión génica de MCP-1 y Rantes (Figura 19B).

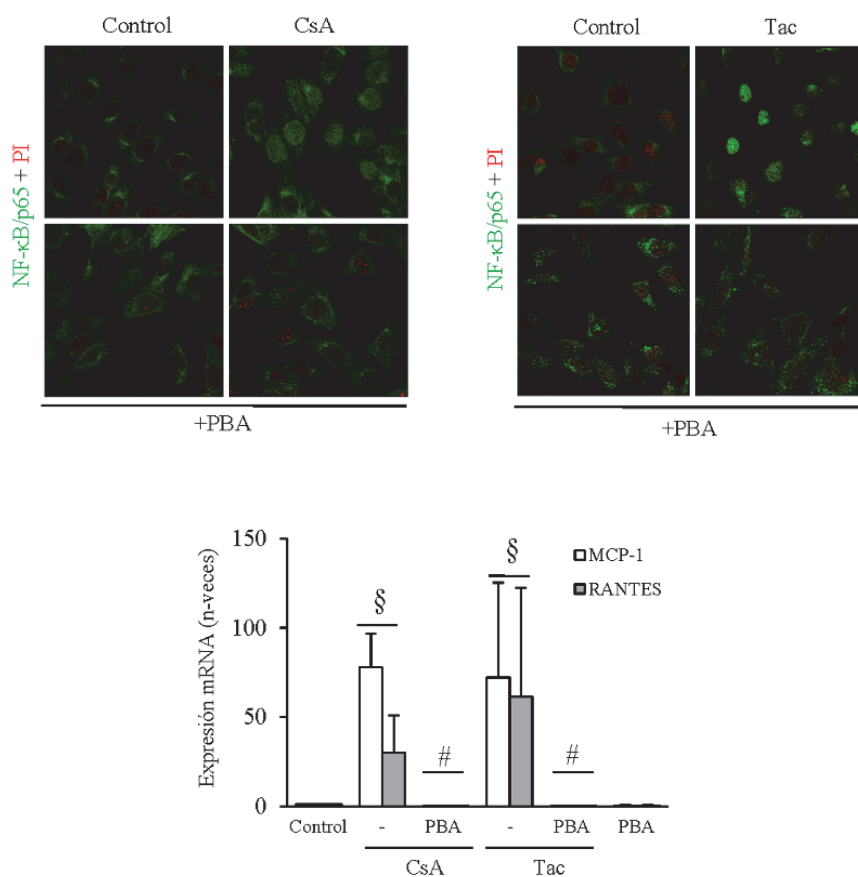


Figura 19. La inhibición farmacológica de la UPR con PBA previene la activación de NF-κB y la expresión génica de quimioquinas inducida por CsA y Tac en células tubulares. (A) Imágenes representativas de la translocación nuclear de p65 mediante inmunofluorescencia (verde) en células MCT pretratadas 1 hora con PBA (10 mM) y posteriormente estimuladas durante 1 hora con CsA (panel izquierdo) y Tac (panel derecho). **(B)** Análisis por PCR de la expresión génica de factores inflamatorios en células MCT pretratadas con PBA y estimuladas durante 6 horas con CsA y Tac. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto al basal. § $p < 0,05$ vs. Control, # $p < 0,05$ vs. CsA/Tac.

Para profundizar en el estudio del papel funcional de las diferentes ramas de la UPR sobre la respuesta inflamatoria promovida por los ACNs, se investigó en primer lugar el papel de la vía PERK/eIF2 α . Estudios previos establecieron que en cultivos de células tubulares, la inducción de CHOP por los ACNs previene la respuesta inflamatoria provocada por el pretratamiento de las células con TNF- α (84). En ausencia de inhibidores específicos de componentes de la vía PERK/eIF2 α , decidimos utilizar el compuesto salubrinal como activador específico de esta ruta. Mediante esta estrategia observamos en primer lugar que el tratamiento de células tubulares MCT con salubrinal, resultó en incrementos de los niveles transcripcionales de CHOP y ATF6, de magnitud comparable con los aumentos inducidos por los ACNs (**Figura 20A**).

Además, en células tratadas con CsA y Tac, el pretratamiento de las células con salubrinal potenció la síntesis proteica de CHOP (**Figura 20B**) y previno la translocación nuclear de NF-κB (**Figura 20C**) y el aumento de la expresión génica de MCP-1 y RANTES inducido por los ACNs (**Figura 20D**), poniendo de manifiesto que la activación de la vía PERK/eIF2α regula negativamente efectos proinflamatorios desencadenados por los ACNs.

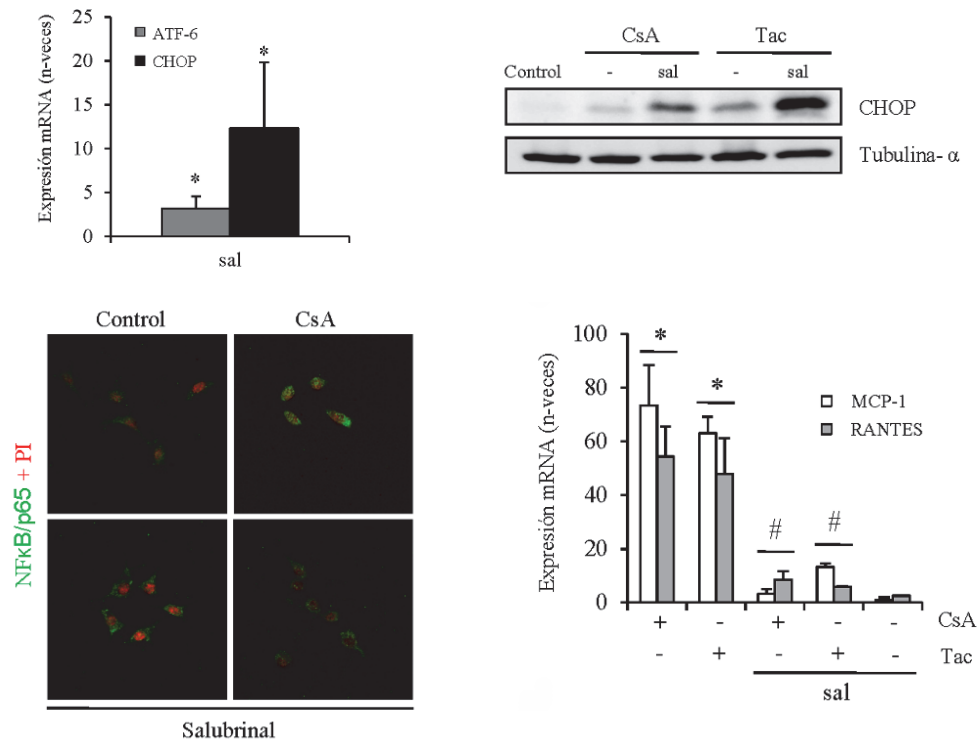


Figura 20. La activación de la vía PERK/eIF2α con salubrinal regula negativamente la respuesta inflamatoria inducida por CsA y Tac. (A) Análisis por PCR de mediadores de la vía PERK en células tubulares MCT tratadas con salubrinal (100μM) durante 6 horas, expresados como número de veces incrementado sobre el control (valor del control: 1). **(B)** Western blot de CHOP en células MCTs pretratadas 1 hora con salubrinal y estimuladas con CsA (10μg/ml) y Tac (20μg/ml) durante 6 horas. **(C)** Imágenes representativas de la translocación nuclear de p65 (fluorescencia verde) en células MCT pretratadas con salubrinal y posteriormente estimuladas con CsA durante 1 hora. **(D)** Análisis por PCR de mediadores proinflamatorios en células MCT preincubadas con salubrinal y estimuladas con CsA y Tac por 6 horas, expresados como número de veces incrementado sobre el control (valor del control: 1). Los datos se expresan como la media ± EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto al valor basal obtenido en células control sin tratamiento. *p<0,05 vs. Control, # p<0,05 vs. CsA/Tac.

Previamente se identificó a IRE1 como promotor de la inflamación en células tubulares bajo estrés metabólico (96). Para conocer el papel de la vía IRE1/XBP1 en la regulación de la inflamación por los ACNs, se realizaron experimentos utilizando el inhibidor específico de IRE1, 4μ8C. En primer lugar, se observó que el tratamiento de células MCT con 4μ8C inhibió la fosforilación/activación de IRE1α (**Figura 21A**) y la translocación nuclear de XBP1 dependientes de CsA (**Figura 21B**). Experimentos posteriores mostraron que en los tratamientos con CsA y Tac, 4μ8C también fue capaz de prevenir la fosforilación/activación de IκBα (**Figura 21C**), la translocación nuclear de NF-κB/p65 (**Figura 21D**) y la

expresión génica de MCP-1 y Rantes (**Figura 21E**). Estos resultados fueron corroborados mediante la utilización de un segundo inhibidor específico de IRE1 α , cmpd, el cual también inhibió la expresión de MCP-1 y Rantes inducida por los ACNs (**Figura 21F**).

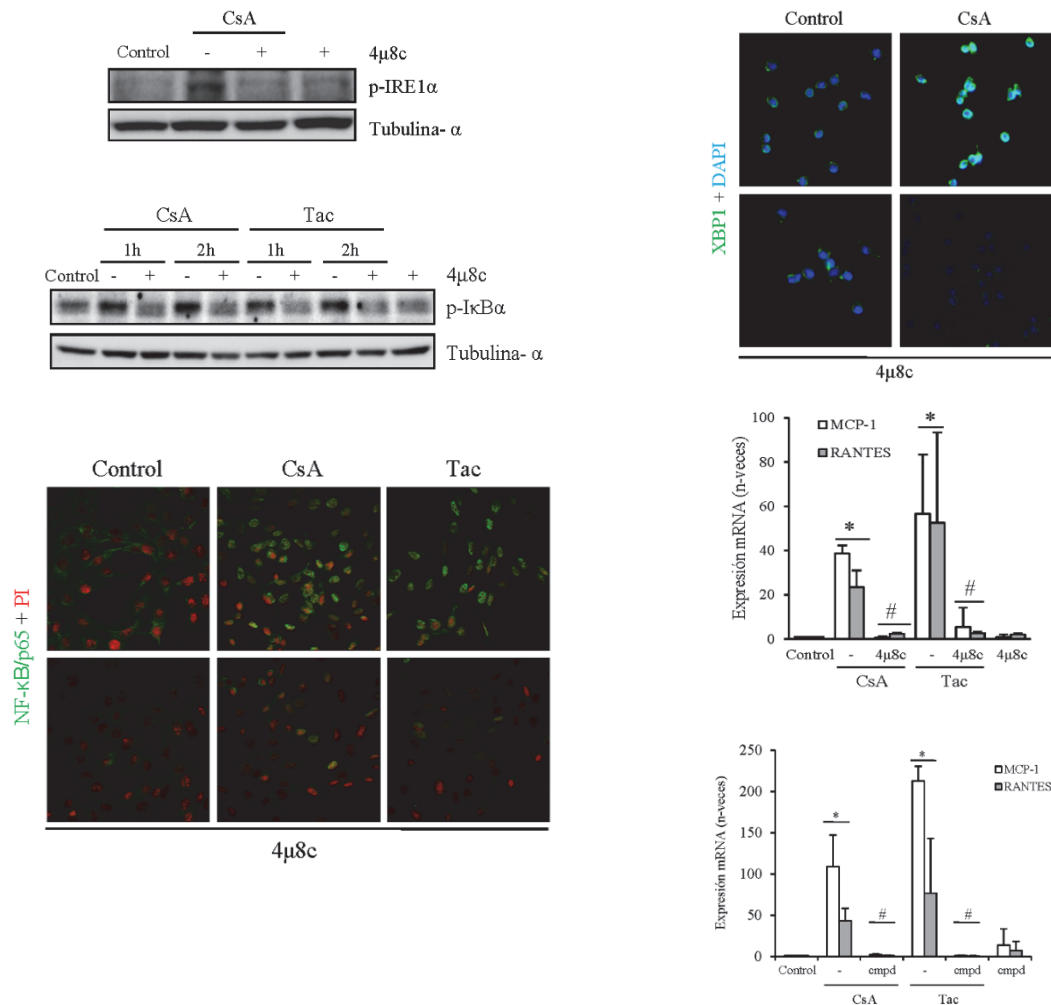


Figura 21. La inhibición farmacológica de la vía IRE1/XBP1 de la UPR por 4μ8C previene la activación del eje IκBα/NF-κB y la expresión de quimioquinas inflamatorias inducida por CsA y Tac en células tubulares. (A) Western blot de los niveles de expresión de la isoforma fosforilada de IRE1 α (p-IRE1 α) en células MCT pretratadas con 4μ8C (25 μM) durante 1 hora y posteriormente estimuladas con CsA (10μg/ml) durante 2 horas. (B) Imágenes representativas obtenidas por inmunofluorescencia de los niveles de expresión y localización subcelular de XBP1 (verde) en células MCTs pretratadas con 4μ8C durante 1 hora y posteriormente estimuladas con CsA durante 3 horas. (C) Western blot de la isoforma fosforilada de IκBα (p-IκBα) en células MCT pretratadas con 4μ8C y estimuladas posteriormente con CsA y Tac durante 1-2 horas. (D) Imágenes representativas de la translocación nuclear de p65 detectada por microscopía confocal (fluorescencia verde) en células MCT pretratadas con 4μ8C y estimuladas posteriormente con CsA durante 1 hora. (E) Análisis por PCR de mediadores inflamatorios en MCT pretratadas con 4μ8C y posteriormente estimuladas con CsA y Tac por 6 horas. (F) Análisis por PCR de mediadores inflamatorios en células MCT pretratadas con cmpd (100 μM) y luego estimuladas con CsA y Tac por 6 horas. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la síntesis basal medida en células control sin tratamiento. *p<0,05 vs. Control, # p<0,05 vs. CsA/Tac.

Tomados en conjunto, los resultados sugieren que el balance del conjunto de respuestas que conforman la UPR, favorecen el proceso inflamatorio desencadenado por los ACNs en el riñón. En particular, la activación de la ruta IRE1/XBP1 se identificó como un activador de respuestas inflamatorias reguladas por NF- κ B. Por el contrario, la activación intrínseca de la vía PERK/eIF2 α podría establecerse como un mecanismo adaptativo frente a la inflamación, cuya regulación farmacológica presenta un potencial interés en la nefrotoxicidad por ACNs.

4.3 Caracterización de la respuesta UPR *in vivo* en el modelo de nefrotoxicidad progresiva por Ciclosporina A

Estudios previos han demostrado que la inhibición de la respuesta UPR mejora la inflamación y el daño renal (85). Los resultados mostrados en el capítulo 4.1 y 4.2 también demuestran que la UPR media los efectos proinflamatorios de los ACNs en células tubulares, sugiriendo que esta respuesta podría participar en la nefrotoxicidad *in vivo*. Por lo tanto, en el modelo murino de nefrotoxicidad por CsA previamente estandarizado estudiamos la presencia de activadores y reguladores de la respuesta UPR previamente identificados en los cultivos de células tubulares. De esta forma, se observó que los riñones de los ratones tratados con CsA durante 10 días presentaron un aumento de la transcripción de ATF3, CHOP, ATF4 y ATF6, comparados con los ratones control (**Figura 22A**). Además, se confirmó mediante western blot un aumento de los niveles proteicos de CHOP y XBP1s (**Figura 22B**), así como una marcada redistribución de IRE1 α en el núcleo de las células tubulares en el tejido renal de los ratones tratados con CsA (**Figura 22C**). Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, analizamos biopsias renales humanas caracterizadas por presentar daño asociado a toxicidad por anticalcineurínicos en ausencia de rechazo agudo. En estas muestras, se corroboró un incremento de la expresión de IRE1 α en los túbulos renales, coincidente con las áreas donde se detectó activación de NF- κ B (**Figura 22D**).

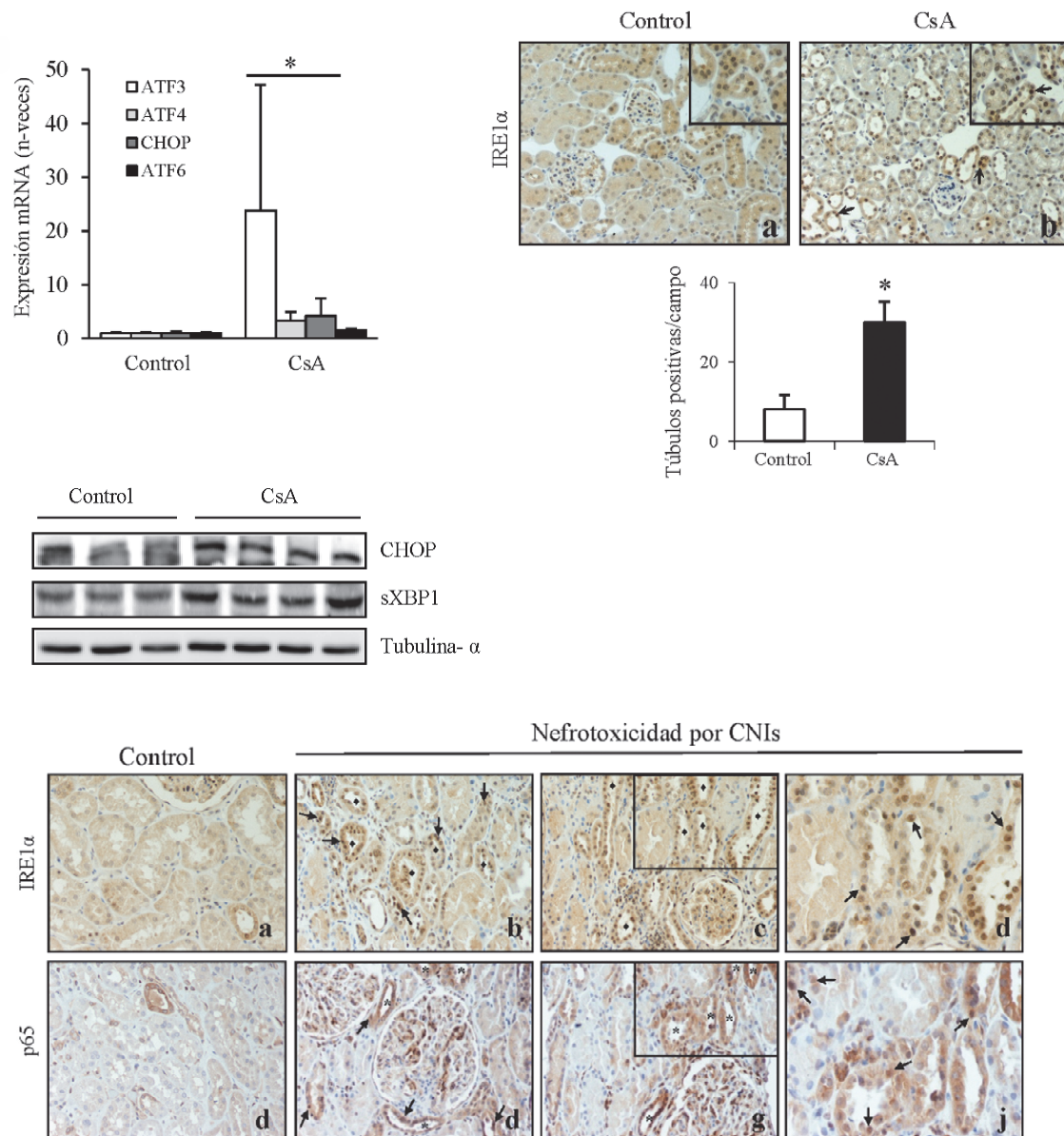


Figura 22. La CsA incrementa la expresión génica y proteica de marcadores de activación de UPR en un modelo murino de nefrotoxicidad y en biopsias renales humanas. (A) Análisis por PCR de marcadores de UPR en riñones de ratones tratados con CsA durante 10 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control. **(B)** Western blot de la expresión renal de CHOP y XBP1s en ratones tratados con CsA por 10 días. **(C)** Imágenes representativas de la expresión de IRE1 α en el tejido renal de: ratones control (a) y ratones tratados con CsA 10 días (b) detectados mediante inmunohistoquímica. En el panel inferior se muestra la cuantificación de la inmunohistoquímica de IRE1 α . Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control. **(D)** Análisis por inmunohistoquímica de la expresión de IRE1 α (panel superior) y p65 (panel inferior) en biopsias renales de pacientes control (a,d) y en pacientes con nefrotoxicidad por ACNs: paciente 1 (b,d) y paciente 2 (c,g). Las zonas dentro de los rectángulos delimitados en c y g se muestran a mayor aumento en d y j. Los diamantes y asteriscos señalan túbulo proximal con marca específica y las flechas indican la localización nuclear de la marca. Magnificación original 200x-400x.

Con el fin de investigar si la respuesta UPR estaba relacionada con la activación de TLR4, analizamos el modelo *in vivo* de nefrotoxicidad por CsA con inhibición farmacológica o molecular de TLR4. Mediante tinción inmunohistoquímica del tejido renal se evidenció que el aumento de expresión y localización nuclear de IRE1 α inducidos por CsA en las células tubulares, se revertía por el bloqueo farmacológico y en ratones TLR4^{-/-} (**Figura 23A**). Además, el análisis transcripcional de genes relacionados a la vía PERK, reveló que los aumentos de CHOP y ATF3 se inhibían significativamente en ambos modelos (**Figura 23B-C**).

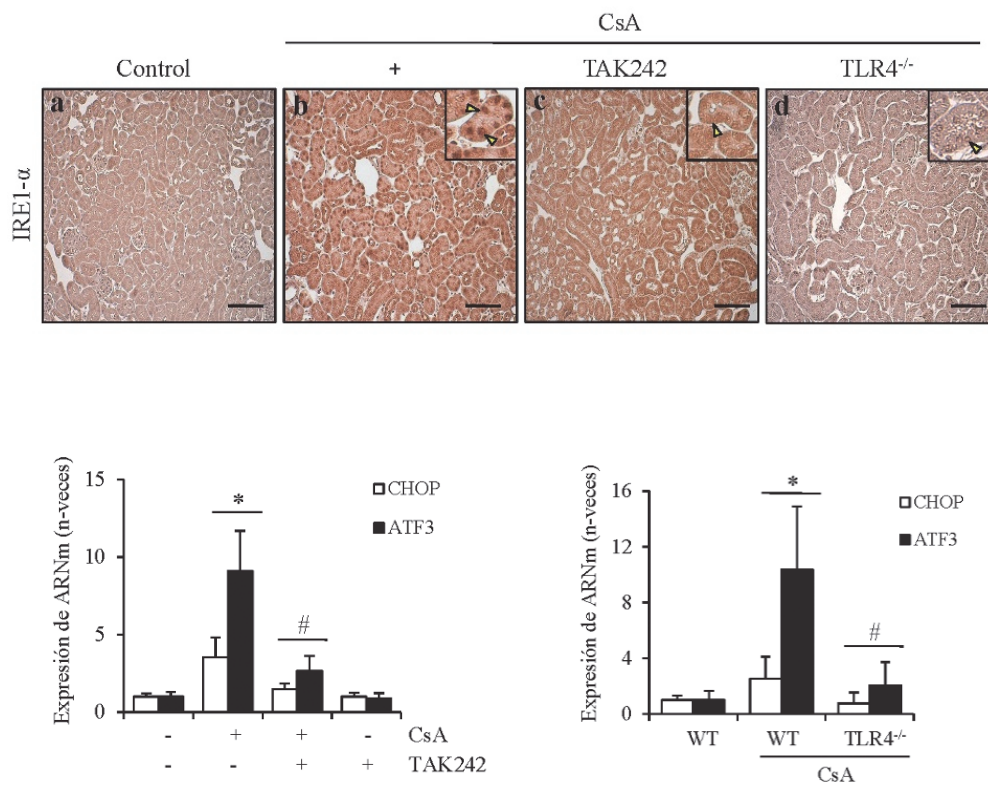


Figura 23. La supresión farmacológica o génica de TLR4 previene la activación renal de vías de UPR en un modelo *in vivo* de nefrotoxicidad por CsA. (A) Imágenes representativas obtenidas por inmunohistoquímica de los niveles de expresión renal de IRE1 α evaluados en: ratones control (a), tratados con CsA (b), cotratados con TAK-242 (c) y en ratones TLR4^{-/-} (d). Las flechas indican la localización nuclear de la marca. **(B-C)** Análisis por PCR de la expresión renal de marcadores de UPR en ratones cotratados con CsA y TAK-242 **(B)** y en ratones TLR4^{-/-} tratados con CsA **(C)**. Magnificación original 200x. Barra de escala 100 μ m. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5-8 ratones por grupo. *p<0,02 vs. Control, #p<0,02 vs. CsA.

Aunque la producción de citoquinas proinflamatorias mediante activación de IRE1 α a expensas de TLR4 se describió en macrófagos, la relación directa de TLR4 sobre la vía PERK/eIF2 α es desconocida. Esta posibilidad se estudió en cultivos de células tubulares MCT tratadas con CsA y Tac en presencia y ausencia de inhibición de TLR4 con TAK-242. Los resultados mostraron que la inducción de la expresión génica de CHOP y ATF3 no se modificó por la inhibición de TLR4 (**Figura 24**), sugiriendo que la regulación positiva de estos genes en el riñón *in vivo* no es un efecto directo de la vía de señalización de este receptor.

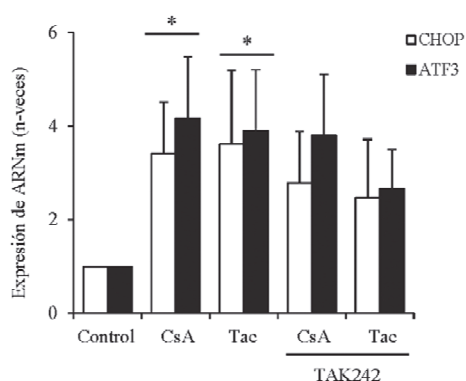


Figura 24. TLR4 no participa directamente en la regulación de la respuesta UPR inducida por ACNs en células tubulares. Análisis por PCR de la expresión renal de marcadores de UPR en células tubulares MCT pretratadas con TAK-242 (10 μ M) durante 6 horas y posteriormente estimuladas con CsA (10 μ g/ml) y Tac (10 μ g/ml) por 6 horas. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto al basal obtenido en células control sin tratamiento. *p<0,02 vs. Control.

5. INHIBICIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE TLR4 CON QM56 EN MODELOS CELULARES Y ANIMALES DE SEPSIS RENAL

En los capítulos 2 y 3 de este trabajo de tesis demostramos que la señalización por TLR4 es una vía principal iniciadora de la reacción inflamatoria renal y vascular por ACNs. Estos resultados demuestran la importancia de la activación de respuestas de la inmunidad innata, y específicamente de los receptores TLR, como mecanismo patogénico ligado al daño renal. Por lo tanto, como reflejan investigaciones recientes, la señalización por TLR4 como diana terapéutica podría resultar de gran interés para el tratamiento de patologías renales y para el desarrollo de nuevos fármacos reguladores de su funcionalidad. En trabajos previos describimos en células renales en cultivo y en el riñón *in vivo* propiedades inmunoregulatoras de la nanomedicina QM56, la cual suprime la expresión de citoquinas proinflamatorias a través de la inhibición de la actividad de proteínas quinasas que regulan la actividad transcripcional de NF- κ B (97). Este factor de transcripción es el principal ejecutor de señales proinflamatorias disparadas a través de TLR4, por lo que hipotetizamos que QM56 podría también inhibir la respuesta inflamatoria dependiente de la señalización por TLR4. Para verificar esta hipótesis desarrollamos un modelo murino de sepsis sistémica y daño renal agudo causado por LPS en cotratamiento con QM56. Los mecanismos regulatorios de QM56 sobre la inflamación se estudiaron en modelos celulares relevantes en la patogenia del daño renal por LPS.

5.1 QM56 inhibe la inflamación renal en un modelo de daño agudo por LPS

Con el fin de estudiar la efectividad de QM56 en prevenir efectos inflamatorios en el riñón causados por activación de TLR4, se implementó un modelo murino de daño renal agudo por administración sistémica de LPS. En este modelo, donde no se observó mortalidad en los tiempos estudiados, se evaluó inicialmente mediante tinción inmunohistoquímica la presencia de células inmunes infiltrantes como un evento resultante del proceso inflamatorio global, observándose un aumento progresivo del infiltrado renal de neutrófilos (MPO⁺) a las 4 y 24 horas posteriores a la inyección sistémica de LPS (**Figuras 25A-B**). Por el contrario, únicamente se observaron incrementos significativos del infiltrado renal de células mononucleares fagocíticas (F4/80⁺) en los ratones tratados durante 24 horas (**Figura 25B**). La intervención de ambos modelos con QM56 reveló una disminución significativa de la marca específica de MPO⁺ en el tejido renal de los ratones tratados con LPS durante 4 horas (**Figura 25A**), así como de F4/80⁺ y MPO⁺ en el modelo de 24 horas (**Figura 25B**).

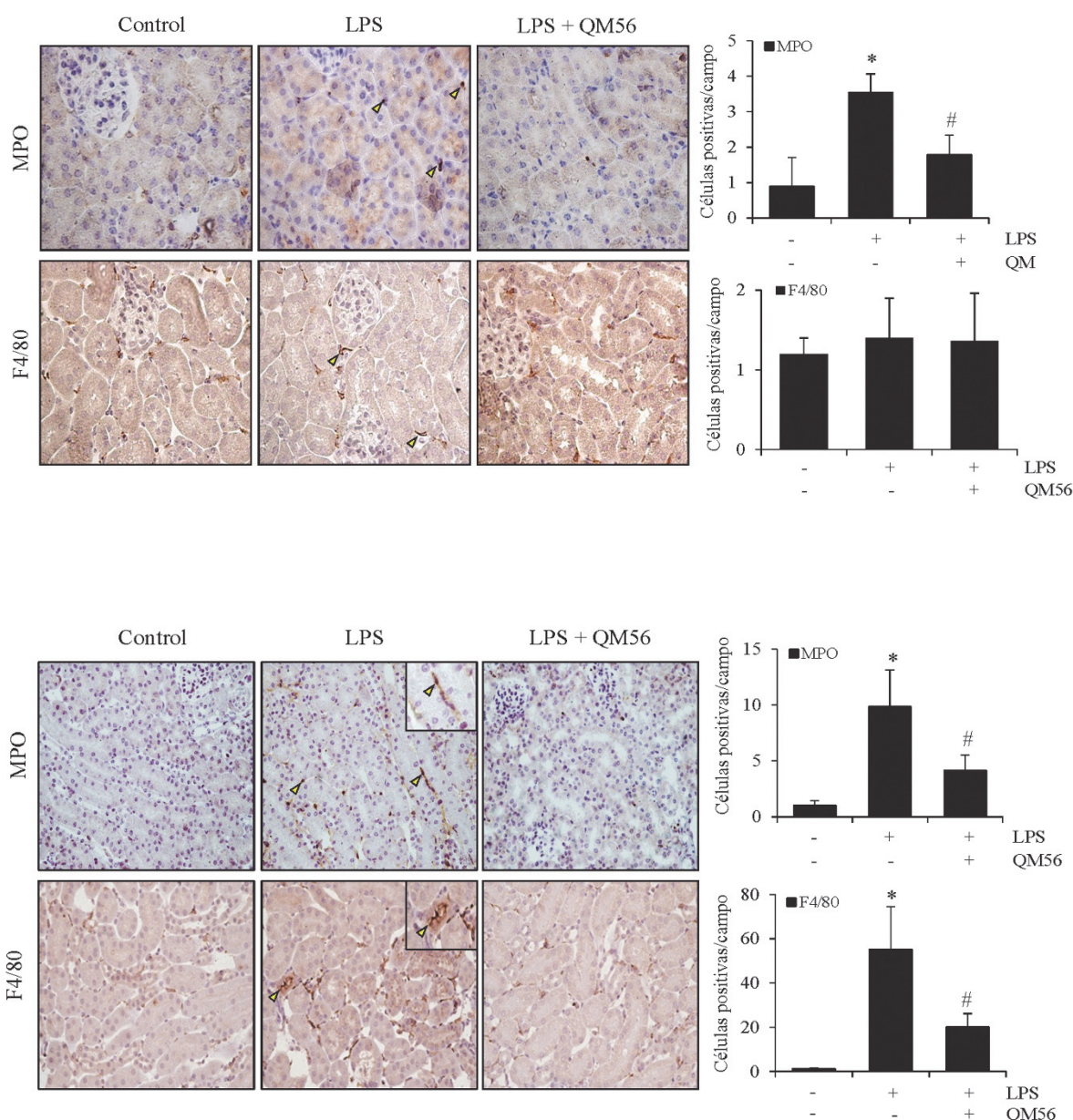


Figura 25. La intervención terapéutica con QM56 de un modelo murino de sepsis renal por LPS previene la infiltración de células inflamatorias en el riñón *in vivo*. (A-B) Inmunohistoquímica del infiltrado renal de neutrófilos (MPO⁺) y células fagocíticas (F4/80⁺) en ratones control, tratados con LPS y cotratados con LPS y QM56 durante 4 horas (A) y 24 horas (B). Las microfotografías son representativas de cada uno de los grupos experimentales estudiados. Los gráficos de barras ilustran la cuantificación correspondiente a cada tinción específica expresada como el promedio del número de células/campo de un total de 10 campos. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 ratones por grupo. * $p < 0,02$ vs. Control, # $p < 0,02$ vs. CsA. Magnificación original 200x.

El análisis de los resultados obtenidos en el modelo de daño renal agudo por LPS, sugería que QM56 podría inhibir determinadas vías moleculares proinflamatorias activadas de modo dependiente de TLR4, por lo que se decidió realizar estudios mecanísticos en células en cultivo.

5.2 QM56 inhibe respuestas proinflamatorias inducidas por LPS en tipos celulares relevantes en la patogenia de la sepsis renal

A partir de los resultados iniciales obtenidos en el modelo *in vivo*, decidimos realizar estudios *in vitro* investigando el mecanismo antiinflamatorio de QM56 en modelos celulares relevantes en el desarrollo de la sepsis renal. A fin de evaluar el potencial efecto de QM56 para inhibir respuestas proinflamatorias asociadas al FRA de origen séptico, células tubulares renales MCT, células endoteliales MS1 y macrófagos RAW264.7 se estimularon con LPS en presencia y ausencia de la nanomedicina. En el caso de las células MCT, la estimulación con LPS indujo un aumento en los niveles génicos de MCP-1, Rantes e IL-6, respuesta que fue significativamente inhibida en células pretratadas con QM56 (**Figura 26A**). En células MS1 tratadas con LPS, se observó un aumento de la transcripción de MCP-1, Rantes e IL-6 (**Figura 26B**) y de los marcadores de activación endotelial ICAM-1, VCAM-1 y SELE (**Figura 26C**). Por el contrario, la síntesis de estos factores se redujo significativamente en células pretratadas con QM56 (**Figura 26B-C**).

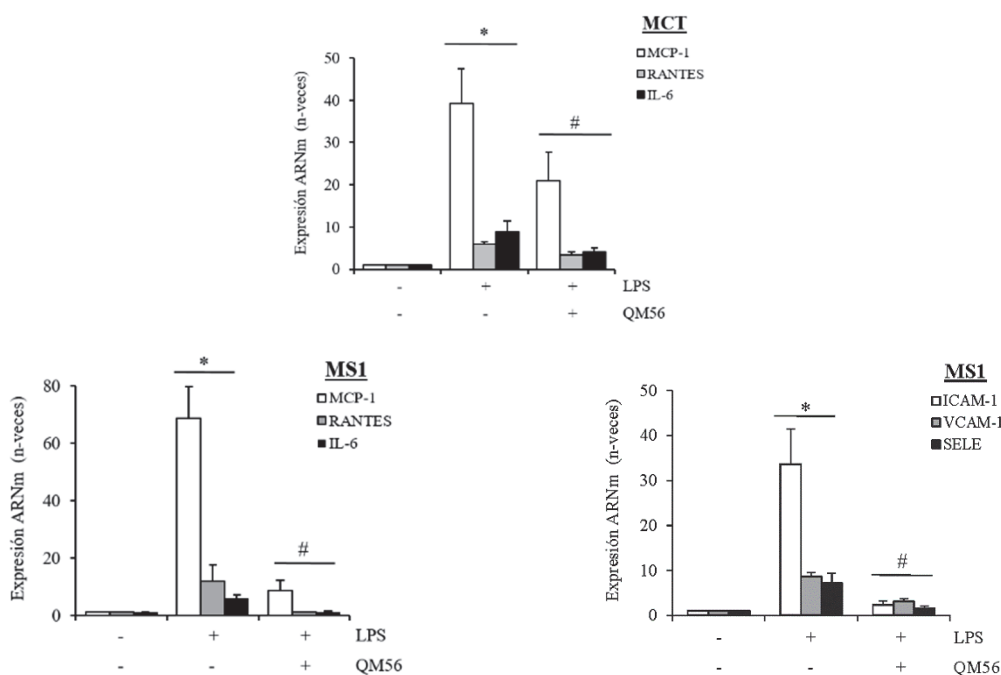


Figura 26. QM56 inhibe la respuesta inflamatoria inducida por LPS en células tubulares y endoteliales murinas. (A) Análisis por PCR de la expresión de citoquinas proinflamatorias en células tubulares MCT pretratadas 1 hora con QM56 (20µM) y estimuladas con LPS (1 µg/ml) durante 6 horas. **(B-C)** Análisis por PCR de la expresión de citoquinas **(A)** y moléculas de adhesión proinflamatorias **(B)** en células endoteliales MS1 pretratadas 1 hora con QM56 y estimuladas con LPS durante 6 horas. Los datos se expresan como la media ± EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la expresión basal para cada gen obtenida en células control sin tratamiento. * $p < 0,02$ vs. Control, # $p < 0,02$ vs. LPS.

Durante el FRA séptico, los mediadores inflamatorios generados por células tubulares y endoteliales en respuesta al daño, promueven el reclutamiento de células del sistema inmune en el riñón, entre las cuales los macrófagos juegan un papel muy importante en el inicio de la respuesta frente a endotoxinas y antígenos extraños, así como favoreciendo la respuesta inflamatoria global (7,8). De este modo, los estudios realizados en macrófagos mostraron aumentos significativos en los niveles transcripcionales de las citoquinas proinflamatorias MCP-1, IP-10, IL-6 y TNF- α tras el tratamiento con LPS, viéndose notablemente disminuidos por el pretratamiento con QM56 (**Figura 27A**). Resultados similares se obtuvieron al analizar la respuesta de genes diana de la señalización por receptores de la familia TLR, como IRF1, IRF7 e IFIT-1, los cuales fueron inducidos por LPS y significativamente reducidos en presencia de QM56 (**Figura 27B**).

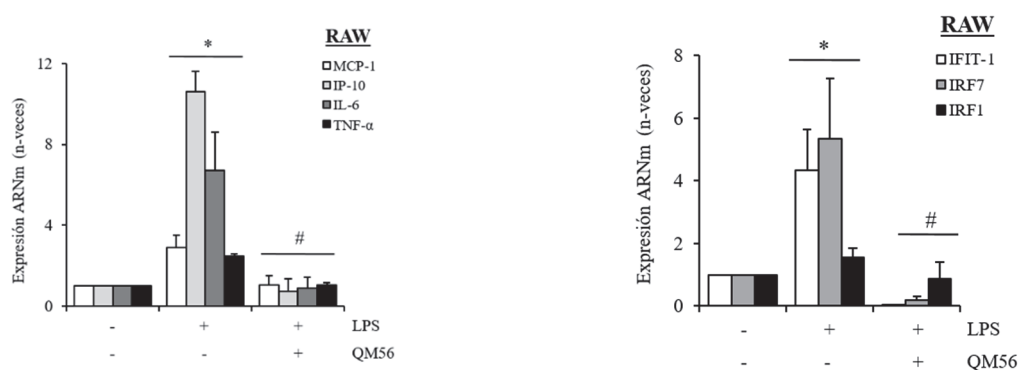


Figura 27. QM56 suprime la respuesta inflamatoria inducida por LPS en cultivos de la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7. (A) Análisis por PCR de la expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos RAW264.7 pretratados 1 hora con QM56 (20 μ M) y luego estimulados con LPS (0,1 μ g/ml) durante 6 horas. **(B)** Análisis por PCR de la expresión de dianas moleculares de TLR4 en células RAW pretratadas 1 hora con QM56 y estimuladas con LPS durante 6 horas. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la expresión basal de citoquinas en células control sin tratamiento. * $p < 0,02$ vs. Control, # $p < 0,02$ vs. LPS.

Para completar este bloque experimental, decidimos corroborar estos resultados mediante el cultivo *ex vivo* de macrófagos aislados de la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6. Mediante ELISA de sobrenadantes, se observó un aumento significativo de los niveles proteicos de IL-6 y TNF- α en los macrófagos peritoneales tratados con LPS, los cuales fueron significativamente inhibidos mediante pretratamiento con QM56 (**Figura 28**).

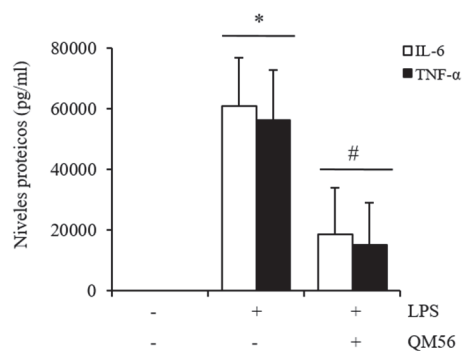


Figura 28 Efectos inhibitorios de QM56 sobre la respuesta inflamatoria inducida por LPS en cultivos primarios de macrófagos peritoneales murinos. ELISA de sobrenadantes a partir del cultivo *ex vivo* de macrófagos peritoneales murinos pretratados 1 hora con QM56 (20μM) y estimulados con LPS (0,1μg/ml) durante 24 horas. Los datos se expresan como la media ± EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto al contenido basal de proteínas en sobrenadantes de células control sin tratamiento. *p<0,01 vs. Control, #p<0,01 vs. LPS.

Estos resultados sugieren la participación de QM56 como un regulador de la ruta de señalización de TLR4, como mecanismo inhibitorio conservado en diferentes tipos celulares involucrados en la fisiopatología del daño renal por sepsis.

5.3 QM56 inhibe la activación de MAPKs y no impide la activación de NF-κB

Nuestro siguiente objetivo fue averiguar sobre que diana específica de la vía de señalización de TLR4 podría ejercer su efecto QM56. Las MAPKs son reconocidos mediadores de la señalización por TLR4, cuya activación es de fundamental importancia para la transcripción de genes inflamatorios por NF-κB en macrófagos. Mediante ensayos de western blot de proteínas totales, observamos un aumento en la fosforilación/activación de las MAPKs: JNK, ERK y p38 inducida por el tratamiento con LPS en células RAW264.7, efecto que fue inhibido por el pretratamiento de las células con QM56 (**Figura 29A**). Además, en células MCTs y MS1, se corroboró que QM56 inhibe la fosforilación/activación de JNK, la principal MAPK involucrada en promover la inflamación renal (46,98) (**Figura 29B-C**).

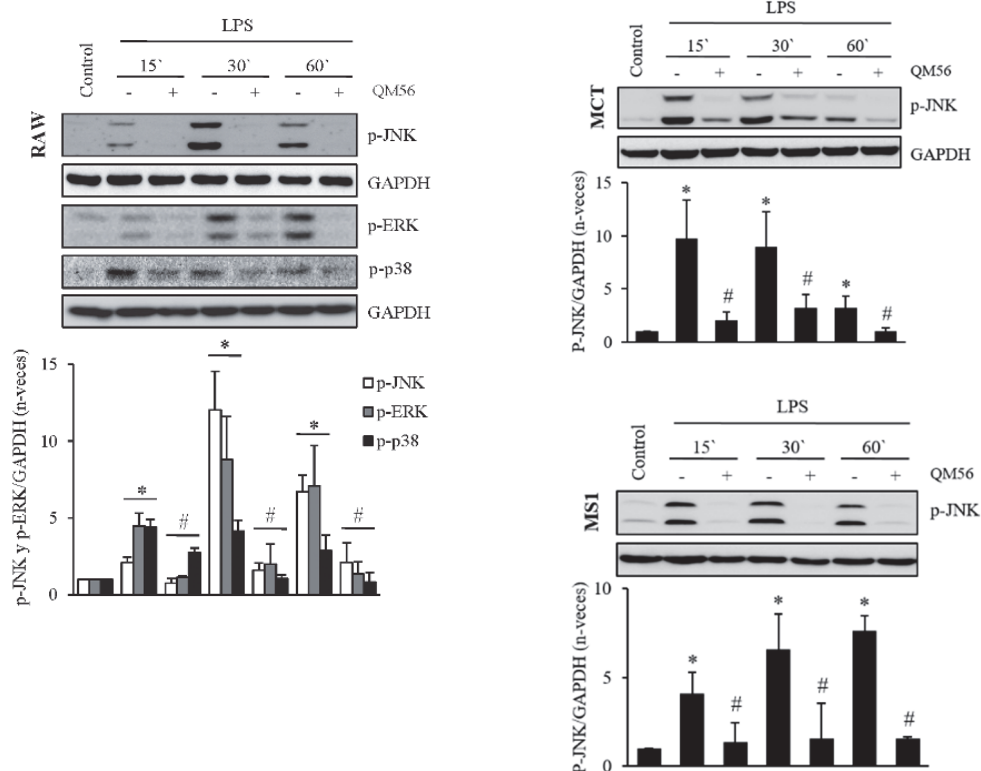


Figura 29. QM56 inhibe la activación de MAPK inducida por LPS en células tubulares (MCT), endoteliales (MS1) y macrófagos (RAW264.7) murinos. En todos los casos, las células fueron tratadas con LPS (RAW 100 ng/ml; MCT y MS1 1 µg/ml) durante los tiempos indicados o pretratadas con QM56 (20µM) durante 1 hora y luego estimuladas con LPS. **(A)** Western blots representativos de la fosforilación/activación de JNK, ERK y p38 en células RAW. **(B-C)** Western blots representativos de la fosforilación/activación de JNK en células MCT (B) y MS1 (C). Los datos se expresan como la media ± EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la expresión génica basal en células control sin tratamiento. * $p < 0,05$ vs. Control, # $p < 0,05$ vs. LPS.

Para corroborar si QM56 efectivamente inhibía la señalización de TLR4 a nivel de la activación de MAPKs, estimulamos células RAW264.7 con ésteres de forbol (PMA), un activador típico de MAPKs a través de la proteína quinasa PKC (99), en presencia o ausencia de QM56. En primer lugar, se observó mediante ensayos de western blot que el tratamiento de las células con PMA incrementaba notablemente la fosforilación/activación de las proteínas JNK y ERK inducido por PMA, y que este efecto era revertido en células pretratadas con QM56 (**Figura 30A**). Además, se verificó que QM56 inhibía la expresión de IL-6 dependiente de PMA, corroborándose de este modo efectos antiinflamatorios de QM56 por inhibición de MAPKs (**Figura 30B**).

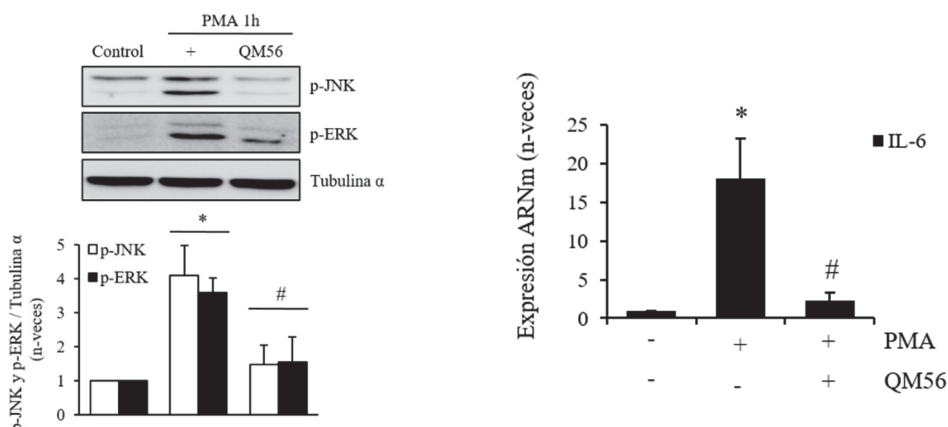


Figura 30. QM56 inhibe la expresión génica de IL-6 y la activación de MAPKs en macrófagos RAW264.7 estimulados con PMA. (A) Western blot representativo de la fosforilación/activación de JNK y ERK en macrófagos pretratados con QM56 y estimulados con PMA por 1 hora. (B) Análisis por PCR de la expresión de IL-6 en macrófagos RAW264.7 pretratados 1 hora con QM56 (20 μ M) y estimulados con PMA (100ng/ml) durante 6 horas. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la expresión de IL-6 en células controles sin tratamiento. * $p < 0,05$ vs. Control. # $p < 0,05$ vs. PMA.

Para conocer si QM56 afectaba directamente la señalización por NF- κ B, se estudió la activación de esta ruta a través de la detección de la proteína fosforilada I κ B α y de la translocación nuclear de p65. De manera destacable, y a diferencia de su efecto inhibitorio sobre MAPKs, observamos que el tratamiento con QM56 no impedía ni la fosforilación/activación de I κ B α (**Figura 31A**) ni el tránsito desde el citosol al núcleo de p65 (**Figura 31B**), ambos fenómenos inducidos por el tratamiento con LPS. Estos resultados sugieren que QM56 podría regular la actividad transcripcional de NF- κ B mediante inhibición de la actividad de factores de transcripción accesorios activados como consecuencia de la acción de MAPKs.

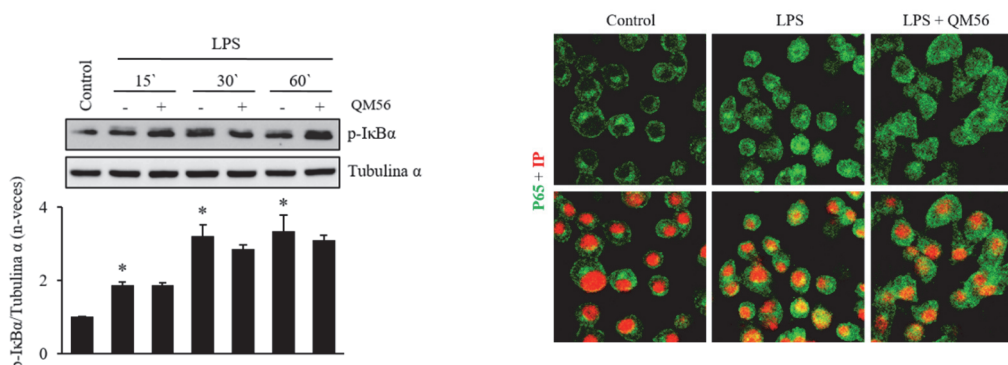


Figura 31. QM56 no previene la activación de la vía de NF- κ B inducida por LPS en macrófagos RAW264.7. (A) Western blot de la fosforilación/activación de I κ B α en macrófagos pretratados 1 hora con QM56 (20 μ M) y posteriormente estimulados con LPS (100 ng/ml) entre 15-60 minutos. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la fosforilación basal de I κ B α en células control sin tratamiento * $p < 0,05$ vs. Control. (B) Microfotografías representativas de la translocación nuclear de p65 (fluorescencia verde) evaluada mediante inmunofluorescencia en macrófagos pretratados con QM56 y posteriormente estimulados con LPS durante 60 minutos.

5.4 QM56 inhibe respuestas inflamatorias dependientes de la activación de TLR2 por el ligando LTA

De forma complementaria, quisimos evaluar *in vitro* si QM56 era capaz de inhibir respuestas proinflamatorias dependientes de la activación de otros receptores de la familia de los TLRs, como es el caso de TLR2, también activado durante el daño renal agudo séptico. Para ello, la línea celular de macrófagos RAW264.7 fue estimulada con LTA como ligando específico de TLR2, revelando en su análisis por PCR un aumento en los niveles de expresión de citoquinas dependientes de esta activación como IL-6 e IL1 β , así como la inhibición significativa de estos genes mediante el pretratamiento con QM56 (**Figura 31**). Dado que los mecanismos de señalización de TLR4 y TLR2 están altamente conservados, este resultado abre la posibilidad de que el espectro inhibitorio de QM56 se extienda a procesos inflamatorios renales donde la participación de estos receptores es un hecho demostrable.

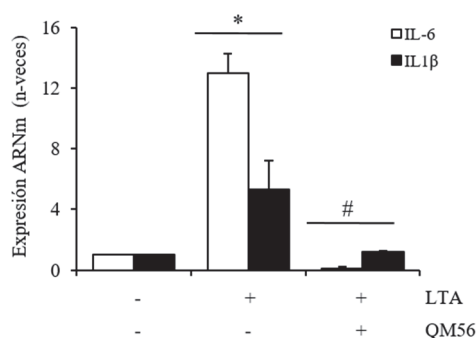


Figura 31. QM56 bloquea la expresión de citoquinas proinflamatorias dependientes de TLR2 en macrófagos murinos. Análisis por PCR de la expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos RAW264.7 pretratados 1 hora con QM56 (20 μ M) y estimulados con LTA (10 μ g/ml) durante 6 horas. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la expresión génica en células control mantenidas sin tratamiento. * $p < 0,05$ vs. Control. # $p < 0,05$ vs. LTA.

Mediante el análisis de todos los resultados obtenidos a partir de la experimentación *in vitro*, podemos concluir que el efecto inhibitorio de la nanomedicina QM56 se produce a nivel de la activación de MAPKs, un evento clave en la regulación de la transcripción de genes proinflamatorios dependientes de NF- κ B, el principal promotor de la respuesta inflamatoria ligada al daño renal.

6. PAPEL DE LA QUIMIOQUINA CCL20 Y RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS ASOCIADAS EN LA INFLAMACIÓN RENAL POR ACNs

6.1 Análisis transcriptómico de la respuesta inflamatoria inducida por CsA y Tac en células tubulares murinas

Las citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y sus receptores son importantes mediadores del daño renal. Con el fin de identificar moléculas potencialmente involucradas en la nefrotoxicidad por ACNs, se realizó un array de expresión génica a partir de células tubulares MCT estimuladas con CsA o Tac. El análisis transcriptómico tras 6 horas de tratamiento con los ACNs, reveló un aumento significativo de la expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas (**Tabla 7**). De manera destacable, se identificó a CCL20 como la quimioquina diferencialmente más expresada, con aumentos superiores a 20 y 10 veces respecto al control en los tratamientos con CsA y Tac respectivamente, los cuales fueron marcadamente superiores a los cambios experimentados por CCL2 y CCL5, dos quimioquinas con alta reactividad durante el daño renal. La destacable elevada expresión génica de CCL20, nos alentó a estudiar en profundidad el rol funcional de esta quimioquina en el contexto de la nefrotoxicidad por CsA.

Función del gen/categoría	Símbolo del gen	CsA ^a	FDR CsA ^b	TAC ^a	FDR TAC ^b
Quimioquinas y mediadores inflamatorios	<i>Ccl20</i>	20,5	0,013	13,5	0,020
	<i>Ccl2</i>	10,6	0,002	11,6	0,002
	<i>Ccl5</i>	6,8	<0,001	15,3	<0,001
	<i>Cxcl10</i>	4	0,009	4,6	0,004
	<i>Ccl7</i>	3,6	0,017	4,7	0,004
	<i>Ccl2</i>	2,8	0,006	3,5	0,002
	<i>Il15ra</i>	2,3	0,039	2,5	0,025

Tabla 7. Análisis transcriptómico realizado en células tubulares en cultivo estimuladas con CsA o Tac durante 6 horas. Se muestra un listado de genes relacionados con quimioquinas y mediadores inflamatorios.

^a Tasa de expresión de genes relativa al control (n veces)

^b FDR (False Discovery Rate) en valores de p normalizados

6.2 Los ACNs promueven la expresión génica de CCL20 en los tipos celulares más relevantes de la inflamación renal

A partir de los resultados iniciales del análisis transcriptómico, realizamos estudios de corroboración mediante PCR de la inducción de CCL20 por CsA y Tac en células tubulares renales y en células endoteliales, dos tipos celulares que en resultados previos de esta tesis demostramos estar involucrados en la nefrotoxicidad experimental por ACNs. Además, también estudiamos la expresión génica de CCL20 en macrófagos, una célula clave en el inicio y mantenimiento de la inflamación. Los resultados indicaron que tanto CsA como Tac indujeron aumentos significativos de la expresión génica de CCL20 en todos los tipos celulares estudiados (**Figura 32A-C**). Estos resultados se corroboraron mediante la detección de la CCL20 secretada en cultivos de células MS1 (**Figura 32D**).

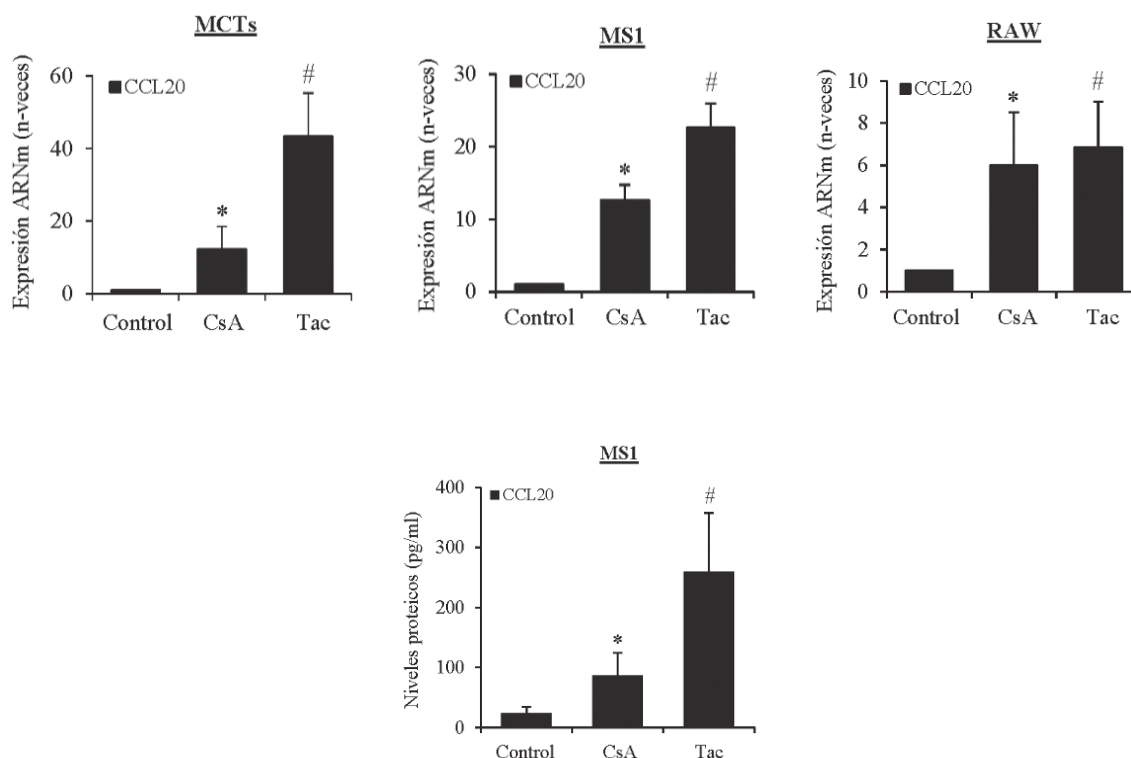


Figura 32. Los ACNs aumentan la expresión génica de CCL20 en células tubulares, endoteliales y macrófagos murinos. (A-C) Análisis por PCR de la expresión de CCL20 en células MCT (A), MS1 (B) y RAW (C) estimuladas durante 6 horas con CsA (10 µg/ml) y Tac (20 µg/ml). **(D)** ELISA de CCL20 realizado en sobrenadantes de células MS1 en cultivo tratadas con CsA y Tac durante 24 horas. Los datos se expresan como la media ± EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la expresión basal para cada gen obtenida en células control sin tratamiento. * $p < 0,02$ CsA vs. Control, # $p < 0,02$ Tac vs. Control.

6.3 La CsA induce la expresión génica y síntesis proteica de CCL20 en el modelo murino progresivo de nefrotoxicidad

Para corroborar los resultados obtenidos en los cultivos celulares, estudiamos también en el modelo in vivo de nefrotoxicidad por CsA los niveles de expresión renal de CCL20. Así, detectamos un aumento progresivo de la expresión génica de CCL20 en los riñones de los ratones tratados con CsA durante 5, 10 y 20 días (**Figura 33A**). Los niveles de expresión génica de CCL20 se correlacionan con los observados previamente (capítulo 1) para otras citoquinas proinflamatorias (MCP-1) o de activación endotelial (VCAM-1). Mediante inmunohistoquímica, se observó una mayor expresión de CCL20 en los animales tratados durante 10 y 20 días respecto de los controles sin tratar, con una tinción de la proteína focalizada en áreas tubulares restringidas (**Figura 33B**).

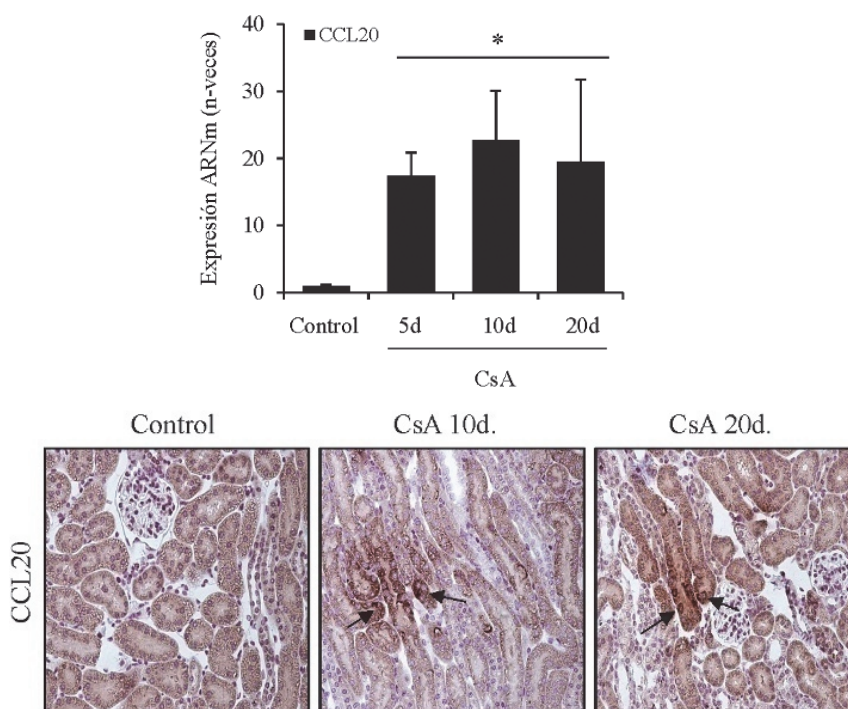


Figura 33. La CsA incrementa de forma progresiva la expresión de CCL20 en un modelo murino de nefrotoxicidad. (A) Análisis por PCR de los niveles transcripcionales de CCL20 en ratones controles sin tratamiento y en ratones tratados con CsA durante 5, 10 y 20 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control. **(B)** Imágenes de IHQ representativas de la detección de CCL20 en el tejido renal de ratones control respecto a los tratados con CsA durante 10 y 20 días. Las flechas señalan la localización tubular de la marca específica. Magnificación original 200x.

Para estudiar si la expresión de CCL20 inducida por CsA en el modelo de nefrotoxicidad dependía de la activación de TLR4, se analizaron nuevamente los modelos murinos de bloqueo farmacológico con TAK-242 o delección génica de TLR4, observando que ambos tratamientos resultaron en una disminución significativa de los niveles transcripcionales de la quimioquina CCL20 inducidos por CsA (**Figura 34**).

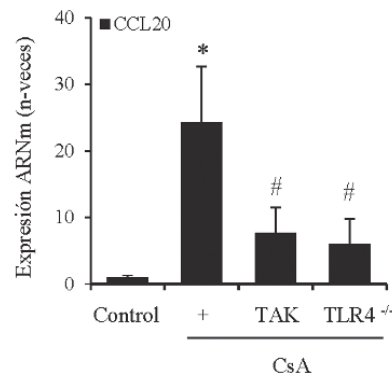


Figura 34. La inhibición farmacológica o la deficiencia génica de TLR4 suprime la expresión renal de CCL20 en un modelo *in vivo* de nefrotoxicidad por CsA. Análisis por PCR de los niveles transcripcionales de CCL20 en ratones cotratados con CsA y TAK-242 durante 10 días y en ratones TLR4^{-/-} tratados con CsA comparados con los ratones del grupo control. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5-8 ratones por grupo. *p<0,02 vs. Control, #p<0,02 vs. CsA.

Además, este resultado fue corroborado mediante experimentación *in vitro*, donde células tubulares MCT y endoteliales MS1 murinas pretratadas con TAK-242 exhibieron una disminución significativa en los niveles transcripcionales de CCL20 inducidos por ACNs (**Figura 35**).

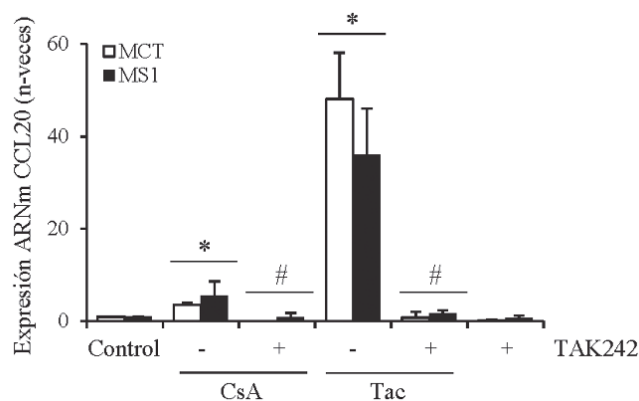


Figura 35. La inhibición farmacológica de TLR4 suprime la expresión renal de CCL20 inducida por ACNs en cultivo de células murinas MCT y MS1. Análisis por PCR de los niveles transcripcionales de CCL20 en células tubulares MCT y endoteliales MS1 pretratadas 6 horas con TAK-242 (10 μ M) y estimuladas durante 6 horas con CsA (10 μ g/ml) y Tac (20 μ g/ml). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados respecto a la expresión basal del gen obtenida en células control sin tratamiento. *p<0,05 vs. Control, #p<0,05 vs. CsA/Tac.

Mediante el análisis de los resultados presentados previamente en este capítulo, concluimos que el tratamiento con ACNs incrementa los niveles de expresión de CCL20 en los tipos celulares más relevantes en la inflamación renal, así como en el riñón *in vivo*, y que su inducción es dependiente TLR4. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si CCL20 tiene un papel funcional relevante como mediador o regulador de la respuesta inmune y la nefrotoxicidad por CsA

6.4 Bloqueo de CCL20 en el modelo de nefrotoxicidad por CsA

Una vez confirmado que CsA es un inductor de CCL20 en células involucradas en la patogenia del daño renal, como así también en el riñón *in vivo*, se trató de esclarecer el papel de CCL20 en el modelo de nefrotoxicidad por CsA mediante una estrategia de bloqueo con anticuerpos monoclonales. En el modelo murino de nefrotoxicidad por CsA, el bloqueo funcional de CCL20 resultó en un aumento adicional de los niveles transcripcionales de MCP-1, IP-10 y CXCL-1 inducidos por CsA transcurridos 10 días de tratamiento (**Figura 36A-B**). Además, los animales cotratados con CsA y el anticuerpo anti-CCL20 (α -CCL20), mostraron mayores niveles de expresión génica de KIM-1 (**Figura 36A**). Estos resultados sugieren que el bloqueo funcional de CCL20 durante el transcurso de la nefrotoxicidad por CsA podría sostener el estado inflamatorio del riñón y favorecer el daño tubular.

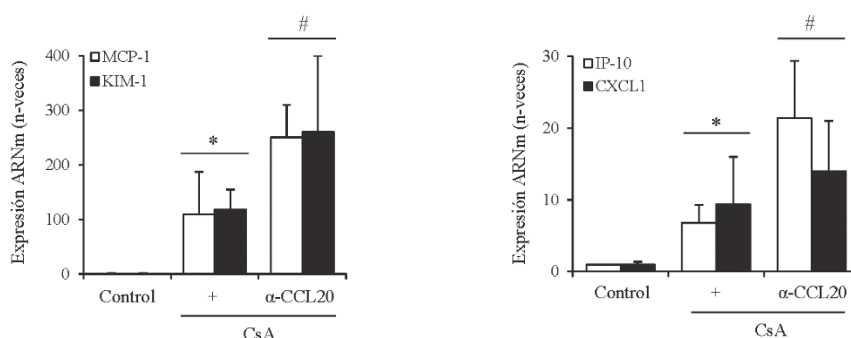
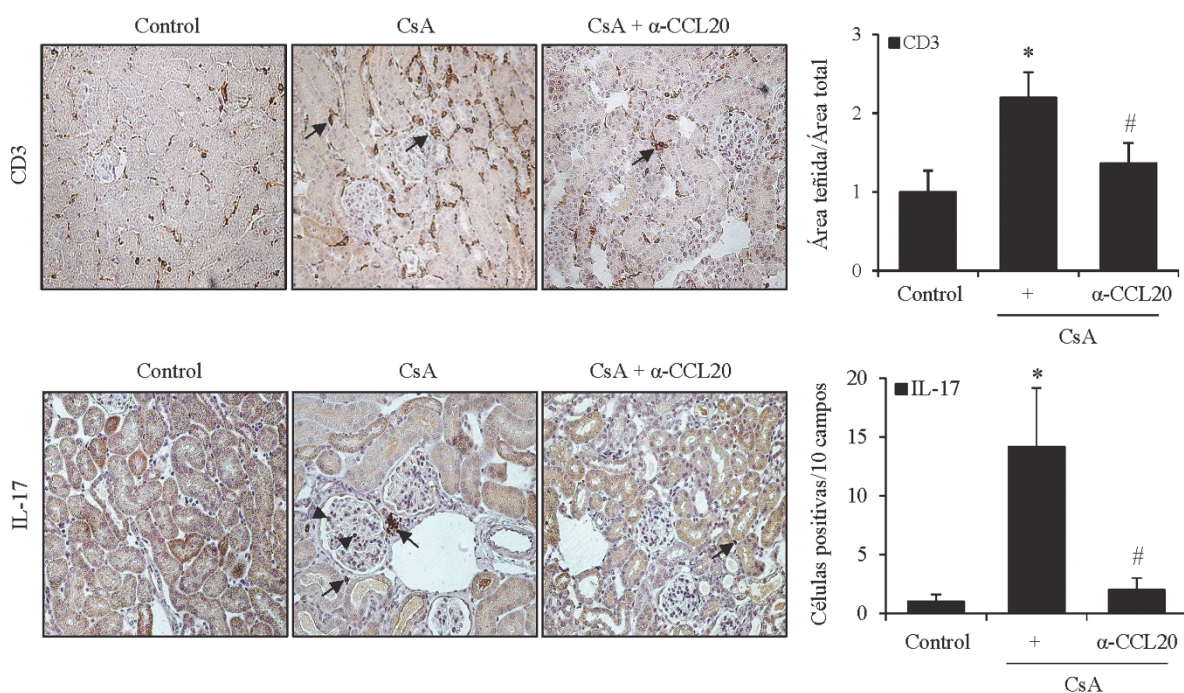


Figura 36. El bloqueo de CCL20 favorece la expresión renal de citoquinas proinflamatorias y sensores del daño tubular en el modelo murino de nefrotoxicidad por CsA. Análisis por PCR de los niveles transcripcionales de KIM-1 y MCP-1 (**A**), IP-10 y CXCL1 (**B**) en ratones tratados con CsA o en cotratamiento con α -CCL20 durante 10 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 ratones por grupo. * $p < 0,02$ vs. Control; # $p < 0,02$ vs CsA.

CCL20 promueve la migración de células del sistema inmune que expresan el receptor CCR6, principalmente células dendríticas, linfocitos T reguladores (Treg) y linfocitos T productores de IL-17 (Th17) (100,101). Para conocer si la aparente acción proinflamatoria del bloqueo de CCL20 era influenciada por la actividad reguladora de CCL20 sobre las respuestas de linfocitos T, se investigó la presencia general de esta población celular mediante marcaje CD3⁺ y de las subpoblaciones Treg y

Th17 en el infiltrado renal mediante inmunohistoquímica del factor de transcripción FOXP3 y de IL-17, respectivamente. De este modo, en los ratones cotratados con CsA/ α -CCL20 se observó una disminución significativa del infiltrado renal de células CD3⁺ y de IL-17⁺, con respecto a los ratones solo tratados con CsA, sugiriendo una inhibición de la actividad quimiotáctica de CCL20 (**Figura 37A-B**). Sin embargo, el análisis de IL-17 por ELISA mostró mayores niveles de expresión de esta citoquina en el grupo de ratones tratados con CsA/ α -CCL20, respecto a los niveles en el grupo tratado solo con CsA, los cuales se mantuvieron sin cambio comparados a los valores basales del grupo control (**Figura 37C**). Estos resultados sugieren que a pesar de que en los ratones sometidos al tratamiento bloqueante de CCL20 la afluencia de linfocitos Th17 sea menor, esta respuesta no sería decisiva en la progresión de la inflamación observada. Además, el aumento global de los niveles de IL-17, refuerza la idea de que la inhibición de CCL20 favorece en este contexto la inflamación. Por otra parte, ni en los ratones controles ni en aquellos tratados con CsA o cotratados con CsA/ α -CCL20 se observó infiltración de células Treg/FOXP3⁺ en el riñón (**Figura 37D**). En cambio, se observó de forma clara un aumento en la proliferación y activación de células Treg/FOXP3⁺ en el bazo de ratones tratados con CsA durante 5 días, disminuyendo su expresión a niveles de control en los bazos de ratones tratados con CsA 10 días. Estos resultados sugieren que los posibles efectos proinflamatorios del bloqueo de CCL20 son independientes de la regulación del balance Th17/Treg, y que, además, la respuesta Treg podría estar dissociada entre el bazo y el riñón, pudiendo la CsA inducir una actividad citotóxica sobre esta población celular, o un bloqueo de la migración de células Treg entre órganos linfoides secundarios y órganos terciarios (**Figura 37E**).



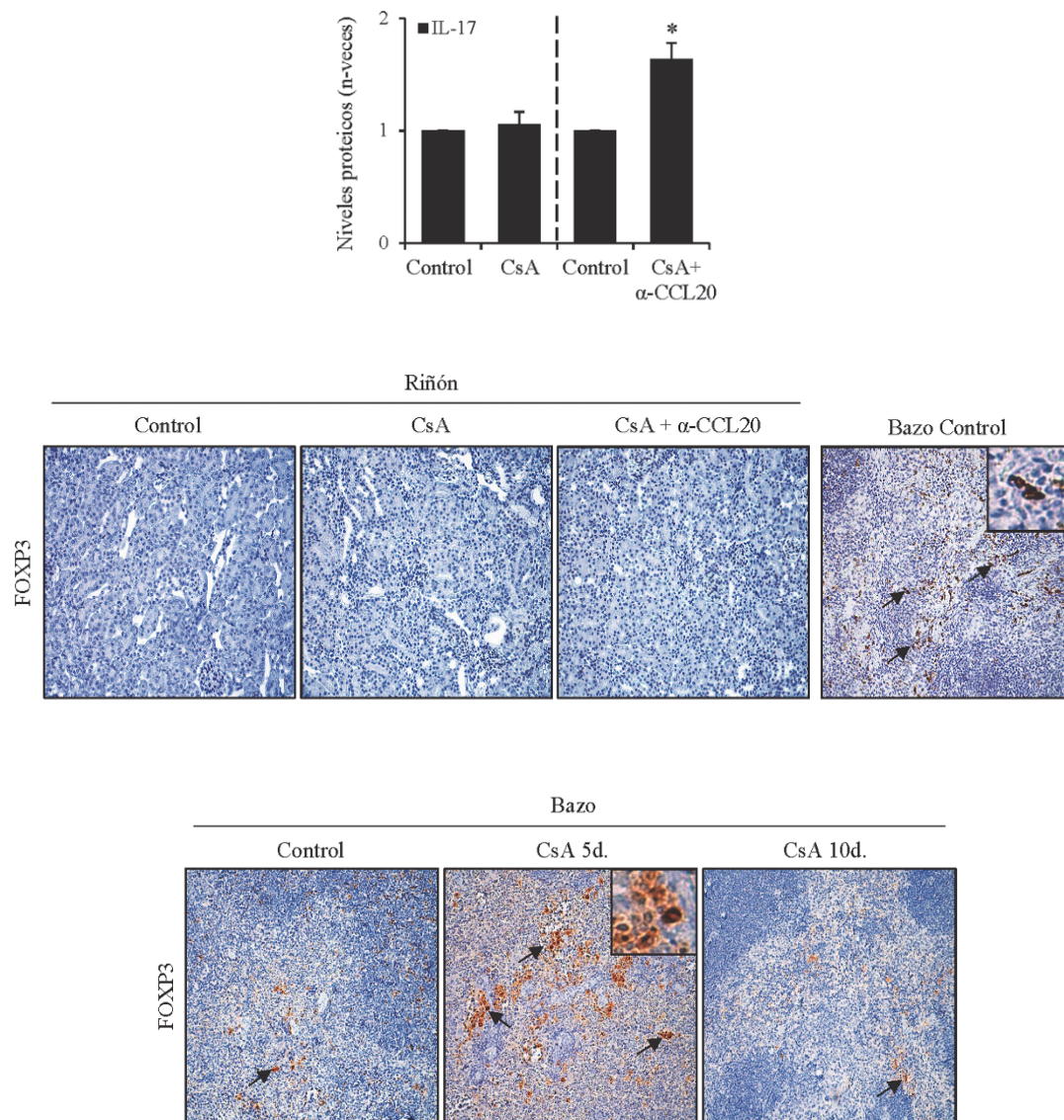


Figura 37. El bloqueo de CCL20 disminuye el infiltrado renal de linfocitos CD3⁺ e IL-17⁺ en el modelo murino de nefrotoxicidad por CsA, pero no participa sobre la población FOXP3⁺. Imágenes de IHQ representativas de la detección de linfocitos CD3⁺ (A) e IL17⁺ (B) en el tejido renal de ratones tratados con CsA/ α -CCL20 durante 10 días comparados con el grupo de ratones tratados solamente con CsA y control. Las flechas señalan la localización tubulointersticial de la marca específica (A-B) mientras que las puntas de flecha señalan una ubicación glomerular (B). En el panel inferior se muestran las cuantificaciones correspondientes. (C) ELISA de extractos proteicos totales a partir de los riñones de los ratones tratados con CsA/ α -CCL20 durante 10 días respecto al grupo de ratones control. (D) Imágenes de IHQ representativas de la detección de Tregs/FOXP3⁺ en el bazo de ratones control comparados con la ausencia de marca positiva en el tejido renal de ratones tratados con CsA/ α -CCL20 durante 10 días (E) Imágenes de IHQ representativas de la detección aumentada de Tregs/FOXP3⁺ en el bazo de ratones tratados con CsA 5 días comparados con ratones control y tratados con CsA 10 días. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 ratones por grupo. *p<0,02 vs. Control; #p<0,02 vs CsA. Magnificación original 200x.

Los resultados del capítulo 1 de esta tesis sugieren fuertemente que la inflamación renal inducida por CsA es un condicionante del proceso fibrótico característico de la nefrotoxicidad por este fármaco. Al respecto, a diferencia de la ausencia de fibrosis constatada en ratones tratados durante 10 días con CsA (Figura 5), la **Figura 39** muestra que en los animales cotratados con CsA/ α -CCL20 aparecen claros focos fibróticos aislados detectados mediante tinción de colágenos precipitados en zonas tubulointersticiales. A pesar de que a este tiempo de tratamiento el proceso fibrótico parece no ser generalizado, la cuantificación muestra diferencias significativas entre el grupo CsA/ α -CCL20 con respecto al grupo control.

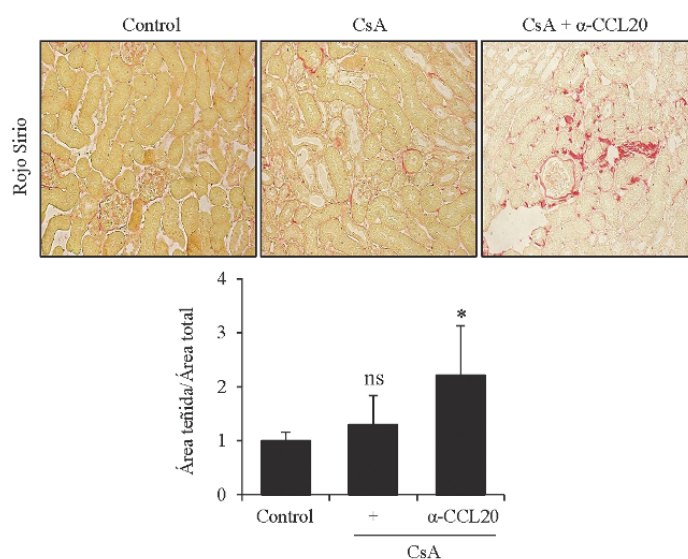


Figura 39. El bloqueo de CCL20 produce fibrosis renal anticipada en el modelo murino de nefrotoxicidad por CsA. Microfotografías representativas de depósitos de colágeno detectados mediante tinción de rojo sirio en tejido renal de ratones tratados con CsA/ α -CCL20 durante 10 días comparados con el grupo de ratones tratados solamente con CsA y controles sin tratamiento. En rojo destacan los depósitos de colágeno tubulointersticial. En el panel inferior se muestra la cuantificación correspondiente. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control. Magnificación original 200x.

El análisis global de los resultados del bloqueo de CCL20 en el modelo de nefrotoxicidad por CsA sugieren una potenciación del proceso inflamatorio, principalmente resultante en una mayor expresión de genes asociados al daño tubular y por un anticipo de la fibrosis. La aparente ausencia de regulación de los efectos del bloqueo de CCL20 sobre las respuestas Th17 y Treg sugieren efectos adicionales de la quimioquina sobre otras células inmunes o sobre células intrínsecas del riñón.

Discusión

1. LA INFLAMACIÓN RENAL COMO MECANISMO PROMOTOR DE LA NEFROTOXICIDAD POR ANTICALCINEURÍNICOS

Existen numerosas investigaciones de carácter clínico y básico que tratan sobre la patogenia de las lesiones agudas y crónicas por ACNs (16,102,103). A pesar de ello, si bien la inflamación renal asociada al uso de ACNs se reconoce como un rasgo patogénico de la nefrotoxicidad, sus mecanismos e influencia sobre la progresión en la nefropatía crónica del injerto no han sido objeto de estudios específicos. En el contexto del trasplante renal, la reacción inflamatoria se asocia al rechazo celular agudo y también como fenómeno predictor de la función renal a largo plazo (104). Sin embargo, la contribución diferencial del efecto inflamatorio de los ACNs es poco evidente en el diagnóstico del rechazo agudo y de la enfermedad crónica del injerto, realizado mediante el análisis anatomopatológico de biopsias del riñón trasplantado. Por lo tanto, parte de este trabajo de tesis estuvo focalizado en investigar y caracterizar mecanismos y mediadores moleculares de la inflamación desencadenantes del daño renal y vascular progresivo inducido por CsA, escogido como modelo de fármaco inmunosupresor de la familia de los ACNs. Para este propósito y a diferencia de los modelos animales habituales de nefrotoxicidad por CsA implementados para estudiar los efectos crónicos del fármaco, estandarizamos un modelo murino de nefrotoxicidad progresiva que nos permitió en primer lugar demostrar que los efectos proinflamatorios inducidos por el fármaco se producen a lo largo de todo el tiempo de tratamiento, desde 5 a 20 días.

El uso continuado de CsA en pacientes renales trasplantados puede causar nefrotoxicidad crónica, caracterizada principalmente por disminución de la función renal, hipertensión y lesiones histológicas irreversibles. Las biopsias de estos pacientes se caracterizan por presentar afectación de las arteriolas aferentes y de porciones distales de arterias interlobulares con formación de depósitos hialinos (arteriopatía hialina). Además, es característico de este proceso la detección de fibrosis intersticial en parches y con un patrón en bandas, y atrofia tubular, consideradas lesiones patognómicas de la nefrotoxicidad crónica por CsA (102,105). Tanto el origen de las lesiones vasculares como tubulointersticiales y glomerulares podrían reconocer un componente inflamatorio, como se discute en profundidad más adelante (3,26,28,46,47). Al respecto, los estudios de caracterización de la respuesta inflamatoria en el modelo de nefrotoxicidad progresiva por CsA indicaron aumentos tempranos y sostenidos en producción de genes de citoquinas proinflamatorias y factores relacionados con procesos inflamatorios asociados, como la activación endotelial.

Así, el continuo aumento de la expresión génica y proteica de estos mediadores inflamatorios a través de todo el periodo de tratamiento con CsA, se correlacionó positivamente con un incremento transitorio en el tejido renal de infiltrado de neutrófilos MPO⁺, así como por el aumento continuo del infiltrado de células mononucleares fagocíticas F4/80⁺ y linfocitarias CD3⁺. La presencia de estos mediadores solubles y celulares de la respuesta inmune revelaron un efecto inflamatorio intrínseco a la acción nefrotóxica de la CsA que se manifiesta de forma temprana y sostenida, efecto que no era conocido y que pudo comprobarse a partir del estudio temporal de la respuesta tóxica del fármaco. Además, el análisis temporal de la respuesta nefrotóxica nos permitió detectar una activación de vías inflamatorias de la inmunidad innata y de respuestas accesorias de la inflamación ligadas al estrés de retículo endoplásmico. Estos resultados nos llevaron a postular una probable relación asociativa entre ambos procesos, que posteriormente también demostramos en células tubulares aisladas estimuladas con CsA y Tac (90).

La inflamación renal está intrínsecamente ligada a la generación y progresión de la fibrosis y a la lesión tubular y glomerular (10,56). Al respecto, pese a la rápida inducción de genes profibróticos observada desde las fases iniciales del tratamiento con CsA, la deposición de proteínas de matriz en el espacio tubulointersticial no fue detectada hasta los 20 del inicio del tratamiento. Estos resultados, junto con la observación de que la inflamación estaba bien establecida tras 5 días de administración continua de CsA, sugieren que este proceso precede a la fibrosis, y que, por lo tanto, podría ser un condicionante de la nefropatía crónica por CsA. Gran parte de los patrones de daño encontrados en la patología humana son reproducibles, al menos de forma parcial, en los modelos murinos experimentales de nefrotoxicidad crónica por CsA. En nuestro modelo de administración sistémica de CsA, describimos una progresión del daño tubular directamente relacionado con el tiempo, caracterizado por dilatación, vacuolización, pérdida de celularidad y formación de depósitos intraluminales hialinos en las células tubulares, además de un aumento de expresión de los biomarcadores de estrés y daño tubular. A diferencia del marcado efecto proapoptótico de la CsA observado en cultivos celulares, la apoptosis tubular *in vivo* se vio de forma aislada, por lo que probablemente aparezca más frecuentemente como una lesión subletal mayormente dependiente de la inflamación.

En definitiva, el modelo animal implementado para estudiar la nefrotoxicidad de CsA demostró su utilidad para estudiar efectos inflamatorios en función del tiempo, establecer *in vivo* potenciales mecanismos de la inflamación y disociar el componente inflamatorio del daño tubulointersticial.

2. PAPEL DE TLR4 COMO MEDIADOR INFLAMATORIO Y DE RESPUESTAS PATOGENICAS ASOCIADAS EN LA NEFROTOXICIDAD POR ACNs

Una relación de causa y efecto entre la administración de CsA y el aumento en los niveles de expresión de TLR4 fue sugerida en un estudio en el que se analizaron biopsias renales humanas de nefropatía por IgA (88,89), aunque hasta ahora, la implicación del receptor en la nefrotoxicidad por ACNs no ha sido demostrada en ensayos funcionales. En este sentido, anteriormente demostramos que una actividad compatible con TLR4 media la respuesta proinflamatoria inducida por CsA en células tubulares en cultivo (90). De forma complementaria, en esta tesis detectamos que la inyección sistémica de CsA induce en el riñón *in vivo* una mayor expresión de TLR4 y de moléculas asociadas a esta vía de señalización. Estos resultados nos alentaron a estudiar el rol funcional de TLR4 *in vivo* mediante su inhibición funcional por tratamiento farmacológico o supresión génica en ratones TLR4^{-/-}, que nos permitió concluir que el efecto nefrotóxico de la CsA depende casi exclusivamente de la activación de vías de señalización proinflamatorias dependientes de TLR4.

Para conocer si TLR4 era funcionalmente activo en el modelo murino de CsA, evaluamos el estado de activación de rutas de señalización ligadas al receptor. Los efectos proinflamatorios derivados de la activación de TLR4 involucran la señalización a través de rutas de MAPKs y NF-κB. A su vez, la participación de factores de transcripción como c-Jun (activado por MAPKs) y STAT3, posibilita la activación de NF-κB a través de la formación de complejos transcripcionales (46,106–108). En cultivos de células tubulares habíamos demostrado la participación de TLR4 en la activación de MAPKs y de la vía JAK2/STAT3 inducida por ACNs (90). En el modelo murino observamos en primer lugar que la inhibición farmacológica o supresión génica de TLR4 *in vivo* redujo la transcripción renal de factores proinflamatorios solubles (citoquinas y quimioquinas) y de otros mediadores expresados en el endotelio (moléculas de adhesión) inducidos por CsA. Además, estos hallazgos se correlacionaron con la observación de una menor activación de JNK, c-Jun, STAT3 y IκBα, lo que se tradujo en una menor fosforilación de IκBα, confirmándose que la actividad de estos factores es dependiente de TLR4 y que por lo tanto podrían ser mediadores de los efectos inflamatorios derivados de la activación del receptor. Se conoce que las MAPKs (especialmente JNK), STAT3 y NF-κB están involucradas como mediadores de la inflamación y daño renal en diversos modelos experimentales (46,109). Así, el bloqueo de JNK y c-Jun previno el incremento de factores proinflamatorios y la infiltración de leucocitos en modelos de daño isquémico, toxicidad por cisplatino, UUO, autoinmunidad e hiperglucemia (46,110,111). La activación de JNK también resultó dependiente de TLR4 en un modelo de nefrotoxicidad aguda por cisplatino (112).

La activación de JAK2 o de la ruta JAK2/STAT3 por TLR4 fue descrita por primera vez en macrófagos y ocasionalmente en otros tipos celulares (113–115). Sin embargo, se desconoce si la activación de la ruta JAK2/STAT3 está ligada a la señalización por TLR4 en el riñón *in vivo*. La vía JAK2/STAT3 está asociada con la inflamación y fibrosis renal en modelos experimentales de nefropatía diabética, de trasplante renal y de fibrosis por UOU (26,116,117). Investigadores de nuestro laboratorio y nuestros propios estudios demostraron que la ruta de señalización JAK2/STAT3 es activada por CsA tanto en células tubulares en cultivo como en el epitelio tubular *in vivo* y que media acciones citotóxicas e inflamatorias de CsA en células tubulares *in vitro* (73,90). En este trabajo de tesis avanzamos en el conocimiento de la relación entre TLR4 y la vía de JAK2/STAT3 ya que demostramos por primera vez en un modelo animal que esta ruta de señalización se activa de forma dependiente a la activación de TLR4, más precisamente en los ratones tratados con CsA. No obstante, a través de estos resultados no se puede asegurar que la activación de STAT3 sea un efecto directo de la señalización por TLR4. Al respecto, en otras investigaciones de nuestro grupo en células endoteliales con expresión silenciada de TLR4 y tratadas con CsA, la actividad de JAK2 no se vio alterada, a diferencia de la inhibición observada en JNK (90,118). Estas observaciones y el hecho de que no haya constancia bibliográfica de una relación directa entre TLR4 y la vía JAK2/STAT, sugiere que la activación de STAT3 pueda producirse a expensas de la síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias, como es el caso de IL-6 (119), la cual se encontró inducida por CsA.

Tomados en conjunto, estos resultados apoyan el concepto de que, *in vivo*, la inhibición de TLR4 podría reducir la inflamación renal inducida por ACNs mediante la regulación de vías específicas dependientes del receptor como JNK/c-Jun y JAK2/STAT3, de probada participación en la inducción de la inflamación y daño renal.

NF- κ B es un regulador clave en el inicio y resolución de la inflamación renal. Además de ser un efector final de la señalización por TLR4, NF- κ B puede activarse de forma independiente a este receptor a través de diversas vías de señalización. En el riñón, la citoquina TWEAK y su receptor Fn14 se definen como reguladores clave de la activación de NF- κ B y de la inflamación. En trabajos de nuestro grupo hemos demostrado que Fn14 señala también a través de JNK y JAK2/STAT3 (97,120). La expresión de Fn14 se incrementa en modelos experimentales de daño renal agudo y crónico y la inhibición del eje TWEAK/Fn14 reduce la activación de NF- κ B y la expresión de quimioquinas, así como el daño tubular y la fibrosis (121–123). En relación, los resultados de esta tesis demuestran que CsA induce la expresión renal de Fn14 también se incrementa debido a la nefrotoxicidad de CsA y que esta sobreexpresión se manifiesta en forma dependiente de TLR4.

Dentro de los factores inductores conocidos de la síntesis de Fn14 se cuentan citoquinas proinflamatorias como TNF- α , INF γ y TWEAK en combinación con ambas (123–125). Por lo tanto, en la nefrotoxicidad por CsA, la expresión de Fn14 podría incrementarse por citoquinas proinflamatorias producidas a partir de la activación de TLR4 y de este modo contribuir al mantenimiento y amplificación del proceso inflamatorio desencadenado por CsA. La nefrotoxicidad crónica por ACNs se caracteriza por la aparición de fibrosis progresiva. Los resultados de nuestro modelo de intervención de TLR4, ponen de manifiesto el papel central de este receptor en la fibrosis renal inducida por CsA, ya que su bloqueo regula a la baja la expresión génica de mediadores profibróticos, e impide la formación de depósitos de matriz intersticial, fundamentalmente de colágeno. Previamente, diversas investigaciones demostraron una reducción de la fibrosis renal en modelos de UUO y cisplatino desarrollados en ratones TLR4^{-/-}, así como en ratones wild-type con riñones trasplantados proveniente de ratones TLR4^{-/-}, sugiriendo la importancia de TLR4 como un mediador inicial de la fibrosis renal (26,126). Aunque estas investigaciones y nuestros resultados con CsA destacan la participación de TLR4 en la promoción de la fibrosis renal, el análisis de los modelos animales nos permiten conocer si la inhibición de TLR4 incide de manera directa en una menor síntesis de factores profibróticos, o si por otra parte, se produce como un efecto indirecto, secundario a la inhibición del proceso inflamatorio. Dado que demostramos que la síntesis de factores profibróticos y la inflamación se producen de manera concomitante *in vivo*, llevamos a cabo experimentación *in vitro* sobre fibroblastos renales para esclarecer la posible sucesión temporal de estos procesos. Los resultados obtenidos de estos experimentos mostraron que la inhibición farmacológica de TLR4 no interfiere en la síntesis de factores profibróticos, aunque sí lo hace en la producción de citoquinas inflamatorias. Estos resultados sugieren que la fibrosis sería un proceso dependiente y subyacente a la inflamación, ya que la inhibición del proceso inflamatorio mediante el bloqueo de TLR4, suprime la respuesta fibrótica renal. En consecuencia, la inhibición de la inflamación redundaría en un enlentecimiento o inhibición de la fibrosis progresiva y de la nefropatía crónica del injerto.

Un hecho destacado que requiere discusión consiste en esclarecer el mecanismo por el cual la CsA activa TLR4. En los riñones de los animales tratados con CsA observamos incrementos en la expresión renal de TLR4, principalmente en el borde luminal de células tubulares y también en áreas glomerulares. Los aumentos de TLR4 se acompañaron de una mayor expresión de Myd88, cambios que podrían reflejar la activación de la ruta de señalización del receptor. Estos resultados acuerdan con investigaciones previas que reportan aumentos de la expresión y una ubicación similar de TLR4 en modelos de daño renal séptico y por cisplatino (112,127).

Mientras que la expresión incrementada de TLR4 *in vivo* podría potenciar los efectos deletéreos de la CsA, en experimentos *in vitro* demostramos efectos proinflamatorios inducidos por CsA y mediados por TLR4 sin aumentos de expresión del receptor.

En conjunto, estos resultados sugieren que el efecto nefrotóxico de la CsA *in vivo* podría depender de la expresión constitutiva de TLR4 y posterior activación en respuesta a la disponibilidad de ligandos endógenos del receptor. Al respecto, en esta tesis demostramos que la CsA favorece el tránsito nucleo-citoplásmico y la secreción de HMGB1. A diferencia de los activadores típicos de la vía TLR4 que promueven la secreción de HMGB1 de manera secundaria a la interacción con el receptor, observamos mediante estudios mecanísticos que la CsA indujo en células tubulares la secreción de HMGB1 a pesar del bloqueo farmacológico de TLR4. Por otra parte, aunque la muerte celular necrótica y apoptótica puede favorecer la secreción pasiva de HMGB1 (91,92), demostramos que este es un proceso activo, independiente de los efectos proapoptóticos de CsA (124). Finalmente, describimos que la inhibición de la movilización núcleo-citoplasma de HMGB1 suprimía la síntesis de citoquinas proinflamatorias inducidas por CsA, por lo que definimos a HMGB1 como uno de los ligandos de TLR4 implicados en la nefrotoxicidad por CsA.

El global de estos resultados demuestra que TLR4 es un mediador principal de la inflamación renal por CsA, y que la aparición de fibrosis esta mayormente supeditada al fenómeno inflamatorio. Además, demostramos que HMGB1 es un activador necesario de TLR4. Por lo tanto, estos resultados nos permiten considerar al receptor TLR4 y a su ligando endógeno HMGB1, como potenciales dianas farmacológicas para el desarrollo de nuevas terapias antiinflamatorias en la nefrotoxicidad por ACNs.

3. PAPEL DE TLR4 COMO MEDIADOR INFLAMATORIO Y DE RESPUESTAS PATOGENICAS ASOCIADAS EN LA TOXICIDAD VASCULAR POR ACNs

La inflamación es un proceso central presente en la patogenia de la disfunción y activación endotelial, el daño vascular y la progresión hacia la enfermedad cardiovascular (128,129). La toxicidad vascular por ACNs es una de las causas que puede agravar la enfermedad vascular asociada al trasplante. Los ACNs inducen toxicidad vascular principalmente a través de cambios en las propiedades del endotelio, lo que se traduce en la generación de daño y disfunción endotelial, principalmente mediante la inducción de estrés oxidativo, apoptosis, proliferación/metabolismo, producción de óxido nítrico (NO) y síntesis de endotelina-1 (130). Estos factores favorecen una respuesta inflamatoria endotelial que incluye la síntesis de citoquinas y moléculas de adhesión. No obstante, el posible papel de la inmunidad innata y mecanismos inflamatorios asociados en el desarrollo de los efectos vasculares adversos inducidos por los ACNs, no han sido abordados de forma específica previamente.

Diferentes efectos de los ACNs relacionados con la inflamación o fenómenos asociados se han descrito en el endotelio. De acuerdo a su carácter inmunosupresor, el pretratamiento de células endoteliales con CsA previno la síntesis de moléculas de adhesión inducida por citoquinas inflamatorias como TNF- α o IL1 β (131). En otro estudio se describió un efecto contrario de CsA incrementando la adhesión promovida por TNF- α /LPS, aunque paradójicamente acompañado por una disminución de los niveles de expresión de ICAM-1, VCAM-1 y ESEL (132). Sin embargo, un efecto similar de CsA favoreciendo la adhesión se acompañó por mayores niveles de expresión de ICAM-1 (133). En estudios realizados en esta tesis demostramos que CsA y Tac por sí mismos inducen la síntesis de genes de activación endotelial, así como de citoquinas proinflamatorias. Además, también demostramos que los ACNs tienen la capacidad de promover efectos proinflamatorios en células vasculares, ampliando de este modo el espectro de tipos celulares sobre los cuales actúa la CsA para inducir inflamación. Estos hallazgos fueron corroborados en el tejido vascular aórtico, aumentando de este modo la relevancia de los hallazgos *in vitro*.

Incrementos en la actividad o expresión de los TLRs, en particular de TLR4, se han asociado con inflamación vascular (34,134,135). En nuestro sistema experimental, demostramos que la inhibición farmacológica de TLR4 en células endoteliales y vasculares *in vitro*, como en cultivo *ex vivo* de aortas murinas o su deficiencia en ratones TLR4^{-/-}, bloqueó la respuesta inflamatoria inducida por ACNs. De manera destacada, el receptor TLR4 también resultó necesario para la expresión de ET-1, conocido péptido vasoconstrictor involucrado en hipertensión (136).

Este resultado refuerza la idea de que la inflamación, activación y disfunción endotelial desencadenados por ACNs son fenómenos lesivos interrelacionados y que en su conjunto podrían constituir un objetivo terapéutico a través de la regulación única de TLR4.

La activación de NF- κ B está asociada con aumentos en la síntesis de quimioquinas en la enfermedad cardiovascular humana y en modelos experimentales de daño vascular (129,137–139), y además NF- κ B es un mediador principal de la respuesta inflamatoria en células endoteliales y vasculares (61,137). En la presente tesis demostramos que NF- κ B forma parte de la señalización por TLR4 inducida por CsA y Tac en el riñón y también en la vasculatura, evidenciando un mecanismo proinflamatorio conservado de los ACNs en tejidos donde su acción tóxica se manifiesta en mayor medida. Así mismo, también identificamos el estrés oxidativo como un evento clave y dependiente de la activación de TLR4 en las células endoteliales y vasculares de aortas expuestas a los ACNs. El estrés oxidativo inducido por ACNs contribuye a la síntesis de mediadores proinflamatorios y de marcadores de estrés endotelial. Estudios previos mostraron la generación de ROS dependiente de la activación de NF- κ B y de la consecuente respuesta inflamatoria, en células vasculares tratadas con Angiotensina II (24,61). La CsA es un conocido inductor de estrés oxidativo y de daño celular en la vasculatura y en el tejido renal (140,141). Igualmente, trabajos de nuestro laboratorio muestran la participación de ROS como mediador de la muerte celular e inflamación inducida por CsA en células endoteliales (73).

Como conclusión, demostramos que TLR4 es un mediador principal en procesos de inflamación, activación y disfunción endotelial por ACNs, donde la vía NF- κ B y la generación de estrés oxidativo ROS dependen de la activación del receptor. La asociación entre la inactivación de TLR4 y la mejora de la patología cardiovascular se ha demostrado en numerosos modelos experimentales de enfermedad cardiovascular (24,142–144).

De este modo, el bloqueo de TLR4 puede resultar un potencial tratamiento para la prevención de la toxicidad vascular del injerto (inflamación, hipertensión, aterosclerosis) inducida por el tratamiento inmunosupresor con ACNs.

4. ESTRÉS DE RETÍCULO Y UPR COMO RESPUESTAS ACCESORIAS A LA INFLAMACIÓN RENAL INDUCIDA POR ACNs

El estrés de retículo endoplásmico y la respuesta UPR están involucrados en la regulación de la apoptosis, la activación de NF- κ B y la inflamación (85,96,145). Mientras que IRE1 regula la actividad basal de IKK, PERK reprime la traducción de I κ B α (146). La inflamación mediada por la respuesta UPR ha sido asociada a la rama IRE1 activada por glucosa en células tubulares (96). En esta tesis, además demostramos la participación de otras ramas de la UPR en los efectos proinflamatorios de los ACNs tanto en células tubulares en cultivo como en el riñón *in vivo*. Además, no solo la inhibición global de la respuesta UPR, sino también de forma específica la inhibición de la rama IRE1/XBP1, anuló la respuesta inflamatoria inducida por ACNs. La relevancia de estos resultados radica en la identificación de la UPR como parte del proceso inflamatorio asociado a la nefrotoxicidad por ACNs. Anteriormente, la participación de la UPR por los ACNs fue involucrada en procesos de vacuolización y citotoxicidad tubular, así como en la promoción de la transición epitelio-mesénquima (70,147,148). Por el contrario, la activación de la vía PERK/eIF2 α /CHOP por los ACNs se vio que modulaba a la baja la respuesta inflamatoria en respuesta a TNF- α en células tubulares (84). En referencia a estas observaciones, nosotros demostramos que la activación de la vía PERK por inhibición de eIF2 α con salubrinal o tratamiento con ACNs limitaba la respuesta inflamatoria y potenciaba concomitantemente la expresión de CHOP, un factor previamente asociado a la prevención de inflamación. Por lo tanto, cabe pensar que los niveles aumentados de CHOP en respuesta a los ACNs fuese una respuesta compensadora de la célula para limitar la inflamación.

Sin embargo, aun en condiciones de activación de respuestas de la UPR preventivas de la inflamación, el tratamiento con ACNs resulta en la activación de NF- κ B y síntesis de citoquinas.

Evidencias de la activación de vías de UPR *in vivo* fueron obtenidas en el modelo murino de nefrotoxicidad por CsA. Asimismo, la inactivación farmacológica o genética de TLR4 en el mismo modelo previno la activación de respuestas dependientes de la UPR (IRE1 α , CHOP y ATF3), potencialmente involucradas en la inflamación y el daño renal en la nefrotoxicidad por CsA. Una relación entre UPR y señalización por TLR4 fue sugerida en investigaciones previas. IRE1 α es un sensor de la UPR que promueve la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos tras la activación de TLR4, señalizando a través de JNK en diferentes tipos celulares. Por otro lado, en modelos murinos experimentales de I/R renal y UUO, así como en biopsias de pacientes con ERC, se encontró que la activación de TLR4 dependiente de CHOP regula la transcripción de genes proapoptóticos y promueve el daño y la fibrosis renal (149–151) y que la de ATF3 regula

negativamente la señalización por el receptor, así como la reacción inflamatoria y la apoptosis. También, la sobreexpresión de ATF3 en células tubulares renales atenúa la síntesis de CHOP inducida por CsA y la muerte celular (152). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestros resultados sugieren que la respuesta UPR inducida por CsA sería un fenómeno proinflamatorio subsecuente a la activación de TLR4 que permitiría la amplificación de la inflamación y de la muerte celular por activación de IRE1/JNK y PERK/CHOP, a pesar de la respuesta compensadora del factor ATF3. También observamos la participación de mediadores ligados a la activación de UPR, específicamente IRE1/XBP1, en biopsias renales de pacientes trasplantados diagnosticados con nefrotoxicidad por ACNs. Sin embargo, los resultados en cultivos de células tubulares sugieren que la respuesta UPR está señalizada a través de vías independientes a TLR4.

En definitiva, concluimos que la UPR activada por ACNs es una respuesta adaptativa cuyo sostenimiento en el tiempo podría promover inflamación y daño renal. La identificación de algunos de los factores y mediadores que intervienen en este proceso, de manera relevante TLR4, podrían ser potencialmente sujetos de intervención farmacológica (46,76,98,121,123,153).

5. INTERVENCIÓN TERAPÉUTICA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TLR4

Los resultados de esta tesis demuestran que la activación de TLR4 es un mecanismo proinflamatorio de respuesta rápida y que regula numerosos procesos patogénicos asociados a la inflamación, como la fibrosis y la activación, y disfunción endotelial que caracterizan el curso de la nefrotoxicidad y toxicidad vascular por ACNs. Precisamente, estos hallazgos sitúan al TLR4 como un potencial objetivo terapéutico para impedir o atenuar la toxicidad renal y extrarrenal de los tratamientos con ACNs. Considerando el receptor TLR4 como un paradigma para el tratamiento de patologías inflamatorias, numerosos estudios hasta la fecha han dado lugar al desarrollo de un número relevante de fármacos experimentales inhibidores de la señalización por TLR4, de probada eficacia en modelos celulares y animales (154–156). Estos fármacos se dividen por mecanismo de acción, pudiendo destacar antagonistas, anticuerpos e inhibidores. Dentro de las moléculas análogas de LPS que actúan como antagonistas de TLR4 destacan CRX-526, E5564 (Eritoran) y TAK-242 (Resatorvid) (154), este último utilizado en esta tesis como herramienta farmacológica para inhibir la activación de TLR4. Mientras que CRX-526 y E5564 se unen al complejo TLR4/MD-2, TAK-242 se une al dominio intracelular de TLR4, bloqueando de este modo la unión de LPS por lo que se han utilizado para el tratamiento o la prevención del shock séptico experimental asociado a infecciones demostrando su eficacia en el bloqueo de citoquinas inflamatorias inducidas por LPS. Además, el compuesto CRX-526 inhibe inflamación y fibrosis en modelos experimentales de nefropatía diabética (157). El fármaco TAK-242 se utilizó en ensayos clínicos para el tratamiento de la sepsis, pero a pesar de su seguridad, el tratamiento no fue efectivo en prevenir el fallo cardiovascular y respiratorio por sepsis. Ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia del compuesto E5564 en pacientes con sepsis severa, diabetes y obesidad son objeto de ensayos clínicos en curso (177, 178, 179). Nuevas moléculas como C34 y C35, se han evaluado recientemente como potenciales inhibidores de TLR4 en enterocitos y macrófagos in vitro, reduciendo además la inflamación sistémica en modelos de endotoxemia y enterocolitis necrotizante (158). La proteína NI-0101 es un anticuerpo monoclonal que impide la dimerización de TLR4, cuyo efecto se ha probado satisfactoriamente en modelos de artritis, inflamación respiratoria y daño orgánico (155). Además, se ha completado un ensayo clínico sobre voluntarios sanos para probar su seguridad y tolerancia (181). También, el anticuerpo monoclonal OPN-305 bloqueante de TLR2 se encuentra en fase clínica para evaluar su seguridad y eficiencia en la prevención de la disfunción crónica del injerto renal (182). Entre los fármacos que intervienen en la vía de señalización intracelular de TLR4, el Paeonol muestra efectos de protección frente al daño renal inducido por endotoxinas mediante supresión de la vía TLR4/NF- κ B (159).

Es por ello que la relevancia patológica de TLR4 y su potencial valor como diana terapéutica pone de manifiesto su potencial uso en la patología renal. En estrecha relación con fármacos reguladores de la actividad de TLR4, se están desarrollando otros centrados en la actividad de HMGB1. De este modo, se ha probado el efecto protector de un anticuerpo neutralizante de HMGB1 en modelos porcinos de I/R renal (160) así como el uso del fármaco inhibidor de HMGB1, Glicirrizina, resultando en una inhibición de la muerte celular e inflamación en modelos murinos renales de I/R (161).

En trabajos previos de nuestro grupo describimos en células renales en cultivo y en el riñón *in vivo*, propiedades inmunoregulatoras de la nanomedicina QM56 en células renales en cultivo y en el riñón *in vivo* (97). El efecto principal de este peptoide conjugado con ácido poliglutámico (PGA) consiste en la inhibición de la apoptosis por inhibir la activación de la caspasa 9 mediante unión a Apaf-1. Además de ser una molécula antiapoptótica, en nuestro grupo se observó una actividad no relacionada de QM56 sobre la inflamación, ya que también es capaz de suprimir la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias a través de la inhibición de la actividad de proteínas quinasas que regulan la actividad transcripcional de NF- κ B (97). El factor de transcripción NF- κ B es el principal ejecutor de señales proinflamatorias disparadas a través de TLRs por lo que hipotetizamos que QM56 podría exhibir capacidad antiinflamatoria mediante la inhibición de la señalización dependiente de TLR4. Para verificar nuestra hipótesis desarrollamos un modelo murino de sepsis sistémica y daño renal agudo inducido por LPS, en el que el cotratamiento con la nanomedicina QM56, redujo el infiltrado renal de neutrófilos y de células fagocíticas. Este modelo nos sugería que QM56 podría inhibir la ruta de TLR4, aunque a través de estos ensayos no podíamos precisar el mecanismo de acción de la nanomedicina. Los efectos antiinflamatorios de QM56 se corroboraron *in vitro* en células relevantes para la inflamación renal activadas con el ligando específico LPS. Estos experimentos nos permitieron establecer que la diana molecular de QM56 se encontraba a nivel de la activación de MAPKs. Para establecer esta conclusión fue clave observar que QM56 también inhibía la síntesis de quimioquinas inducida por PMA, el cual es un activador de MAPKs a través de la quinasa PKC de forma no dependiente de TLR4. QM56 inhibió de forma clara la activación de JNK en todos los tipos celulares ensayados. Como se discutió anteriormente, JNK es la principal MAPK ligada a inflamación en el daño renal experimental y su inhibición tiene efectos beneficiosos sobre el daño y función renal (46,109). Por otra parte, de acuerdo con investigaciones previas de nuestro grupo con citoquinas activadoras de NF- κ B (Ucero et al. 2013), comprobamos que QM56 no impide la activación y traslocación de NF- κ B inducida por LPS. Esta observación es compatible con una actividad de QM56 como inhibidor de la actividad transcripcional de NF- κ B y la síntesis de citoquinas mediante la inhibición de la actividad de factores de transcripción dependientes de la acción de MAPKs como AP-1.

Sobre la factibilidad de inhibir MAPKs se puede decir que uno de los inconvenientes es que son moléculas muy ubicuas y por lo tanto la inhibición podría ser no específica. Esto requeriría terapias con inhibidores dirigidos específicamente a las células renales. En este sentido, las mayores ventajas del desarrollo de nanofármacos, específicamente de compuestos formados por polímero-proteína o polímero-fármaco, conocidos como nanomedicinas poliméricas o nanoconjugados, además de su pequeño tamaño es que constituyen un sistema de transporte y liberación controlada de moléculas con actividad terapéutica (162). Diferentes estudios han demostrado firmemente que la conjugación del fármaco a polímeros lineales naturales (PGA) o sintéticos (PEG), disminuye la toxicidad e inmunogenicidad del fármaco, mejora su estabilidad, favorece la captación y liberación intracelular, y actuación sobre dianas específicas (162).

A pesar de que los primeros nanoconjugados se diseñaron para su aplicación en terapias anticancerígenas, su desarrollo se ha expandido a multitud de aplicaciones terapéuticas.

Los resultados con QM56 son demostrativos de que una nueva generación de fármacos basados en polímeros terapéuticos podría ser una alternativa para la inhibición de la ruta TLR4 y en consecuencia para el tratamiento de la enfermedad renal experimental. En este sentido, aunque los resultados con QM56 son prometedores, serían necesarias modificaciones estructurales del compuesto activo para mejorar su especificidad, así como el desarrollo de sistemas de conjugación especializados que permitan una mayor permeabilización celular para una mayor disponibilidad del principio activo, y una acción dirigida a células de interés.

Estos estudios demuestran que la búsqueda de fármacos con actividad supresora de receptores TLR es un campo activo y que algunos de los compuestos ya desarrollados, u otros que un futuro puedan serlo, podrían ser también de utilidad para el tratamiento de la patología renal por ACNs.

6. REGULACIÓN DE LA NEFROTOXICIDAD POR CCL20 Y RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS ASOCIADAS

La quimioquina CCL20 ejerce su función mediante la unión selectiva a su receptor específico CCR6 expresado en células dendríticas inmaduras, linfocitos B y linfocitos T efectores y de memoria, células NK y neutrófilos. Asimismo, la producción de CCL20 se evidencia principalmente en monocitos, pero también en tipos celulares concretos (DCs y macrófagos pulmonares, fibroblastos dérmicos, y en células epiteliales de vías aéreas, intestino y piel) (163). Mientras que CCL20 se expresa en mucosas de la piel e intestino y también en órganos linfoides, CCR6 se encuentra constitutivamente expresado tanto en órganos linfoides como no linfoides: bazo, nódulos linfáticos, apéndice, páncreas, timo e intestino. Tanto la quimioquina como su receptor se encuentran sobreexpresados en tumores y tejido sinovial de pacientes con artritis, lo que sugiere su participación en la regulación de la inflamación de estos procesos (163). En la patología renal, la participación del eje CCL20/CCR6 está mejor definida en modelos de glomerulonefritis autoinmune experimental tanto favoreciendo respuestas de linfocitos T efectores (Th17), como así también de linfocitos T reguladores (Treg) (41,164). Los resultados de esta tesis muestran que CCL20 es una de las citoquinas con mayor nivel de expresión renal en ratones tratados con CsA, alcanzando niveles comparables a los de MCP-1, de reconocida participación en la inflamación y progreso del daño renal. En el tejido renal *in vivo*, se detectaron, por técnicas inmunohistoquímicas, zonas tubulares aisladas con mayor expresión de CCL20. Sin embargo, otras células como las endoteliales y los macrófagos podrían ser potenciales lugares de síntesis, como lo evidenciaron los experimentos *in vitro* con células de estas estirpes estimuladas con CsA y Tac. Estos resultados acuerdan con otras investigaciones que dan cuenta de la expresión tubular de CCL20 en modelos de nefropatía diabética y en biopsias de pacientes con trasplante de riñón (101,165).

La función de CCL20 ha sido estudiada en algunos modelos inflamatorios de patología no renal. Por ejemplo, la inhibición funcional de CCL20 con anticuerpos neutralizantes inhibió la inflamación y daño en un modelo de colitis por TNBS en ratones, mientras que el silenciamiento de CCL20 en ratones sometidos al tratamiento con cloruro de carbono y LPS mejoró el daño pulmonar (166,167). Estos estudios demuestran que CCL20 puede ser un factor promotor de la inflamación. En cambio, la inhibición de CCL20 en el modelo de CsA estudiado en esta tesis resultó en una aparente exacerbación de la inflamación y el daño, a juzgar por un incremento en la síntesis de genes proinflamatorios y marcadores tubulares de daño celular. Sin embargo, el infiltrado linfocítico detectado a través del marcaje de células CD3⁺ resultó menor en los ratones con inhibición de CCL20.

Un resultado similar con disminución del infiltrado de células CD3⁺ a expensas de un menor número de linfocitos Th17 y Treg, pero con más daño glomerular se encontró en un modelo de glomerulonefritis autoinmune en ratones deficientes en CCR6 (164). En los ratones tratados con CsA no se observó infiltración renal de células Treg, aunque si movilización de células Th17, las cuales disminuyeron significativamente su número en los ratones tratados con el anticuerpo bloqueante de CCL20. Un análisis en profundidad del número de células Th17 y otros tipos linfocitarios mediante técnicas cuantitativas como la citometría de flujo podría facilitar entender a qué subpoblación linfocitaria es atribuible la disminución de células CD3⁺. Las células Th17 se asocian con un fenotipo proinflamatorio y contribuyen a la inflamación y al daño renal en patologías autoinmunes como la glomerulonefritis y en el rechazo agudo, a través de la producción de IL-17 que induce la secreción de mediadores inflamatorios en el tejido diana y promueve la infiltración de leucocitos al foco de lesión (41,42). En los animales con CCL20 inhibida la disminución de células Th17 en el riñón no explica los efectos proinflamatorios del tratamiento y sugieren que este tipo celular podría no tener un papel protagónico en la patogenia de la lesión renal por CsA. Sin embargo, parte de los efectos inflamatorios en estos animales podría atribuirse a la comprobada mayor producción de IL17, la cual reconoce otras fuentes de producción además de las células Th17. Esta conclusión se apoyaría en investigaciones previas sobre modelos de FRA por daño isquémico o cisplatino, donde la inflamación y el daño renal no depende de la respuesta Th17 pero sí de la IL-17 producida por neutrófilos y linfocitos Tγδ (168).

Un dato relevante en el modelo de CsA es que los ratones tratados con el anticuerpo anti-CCL20 mostraron una aparente aceleración de la fibrosis. Este hecho podría deberse a la exacerbación del proceso inflamatorio en este grupo de animales, que, de acuerdo a resultados de esta tesis, es una condición previa y condicionante de la fibrosis desencadenada por CsA. Por lo tanto, el análisis global del modelo de CsA con inhibición de CCL20 indicaría una función de CCL20 que puede depender del contexto. En este caso, en presencia de una respuesta Th17 irrelevante y en ausencia de respuesta Treg, los resultados indican que la inhibición de CCL20 no protege de la nefrotoxicidad e incluso podría favorecerla. Estos resultados podrían ser importantes para investigar los efectos biológicos de CCL20, como la activación de vías de señalización y la síntesis de factores reguladores de la inflamación y fibrosis, entre otros, en el tejido renal intrínseco (células epiteliales, endoteliales, fibroblastos).

Un hallazgo importante realizado en el modelo de CsA y que podría ofrecer explicaciones a la progresión de la nefrotoxicidad por este fármaco es la ausencia de respuesta Treg a nivel renal. A diferencia de otras subpoblaciones de células T, en condiciones basales los linfocitos Treg infiltran no

solo órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos renales) sino también terciarios, como es el propio riñón, asegurando la vigilancia inmunológica y previniendo la autoinmunidad (169,170).

Los resultados presentados en esta tesis nos muestran que en los ratones tratados con CsA se produjo un aumento de linfocitos Treg en bazo a los cinco días de tratamiento, concomitante al inicio de la inflamación renal. No obstante, la infiltración de células Treg en el bazo comenzó a extinguirse con el transcurso del tratamiento. Estas observaciones sugieren que hay una respuesta Treg inicial al tratamiento con CsA, probablemente reflejando el proceso inflamatorio renal, pero que no puede sostenerse en el tiempo por efectos intrínsecos del fármaco. Al respecto, se conoce que la CsA inhibe la actividad de los linfocitos Treg y probablemente imposibilite la diferenciación de células Treg en tiempo por inhibir NFAT e impedir la síntesis de IL-2 en linfocitos T cooperadores (171–174). Sin embargo, este hecho no se ha relacionado con los efectos nefrotóxicos de la CsA. Al respecto, en modelos experimentales de riñón, la depleción de Treg produjo un aumento de la inflamación, necrosis tubular y pérdida de función renal tras el daño isquémico (43). Por el contrario, en modelos animales de daño renal se han utilizado diversas estrategias para activar la respuesta Treg. De esta manera, la activación de la respuesta Treg por inyección sistémica de fosfolipasa A2 o la transferencia adoptiva de células Treg procedentes de ratones wild-type a ratones deplecionados de Treg o en ratones deficientes en FOXP3, previno la infiltración renal de macrófagos y mejoró la función renal producida por daño isquémico y nefrotóxico por cisplatino, resultando en una mayor tasa de supervivencia (43,175,176). Por lo tanto, considerando los resultados obtenidos, en el modelo de CsA podrían darse las condiciones para aplicar estas estrategias para el reclutamiento de la respuesta Treg.

En definitiva, los resultados en el modelo de CsA sugieren que la ausencia de respuesta Treg podría ser importante para la desregulación de la respuesta inflamatoria inducida por CsA en el riñón y que la estimulación de esta respuesta podría evitar o moderar la nefrotoxicidad por CsA.

Conclusiones

CONCLUSIONES

El diseño experimental de modelos celulares y animales de nefrotoxicidad por ACNs nos ha permitido caracterizar los mecanismos de la inflamación renal y vascular, así como de respuestas accesorias involucradas en el proceso inflamatorio y de su progresión hacia la fibrosis y daño renal. Además, hemos investigado *in vivo* tratamientos nefroprotectores basados en la inhibición de respuestas de la inmunidad innata. En conclusión, hemos demostrado que:

- 1) La CsA induce nefrotoxicidad progresiva *in vivo*, caracterizada por una respuesta inflamatoria tubular y de activación endotelial, promotora de la fibrosis y de la lesión renal.
- 2) La movilización de HMGB1 con activación de TLR4 por CsA, juega un papel fundamental en el reclutamiento de la UPR, causando inflamación y fibrosis renal inducida por CsA *in vivo*, por lo que TLR4 es una diana terapéutica en la nefrotoxicidad por anticalcineurínicos.
- 3) Los anticalcineurínicos inducen estrés oxidativo e inflamación endotelial y vascular, mediada por TLR4, por lo que TLR4 es una diana terapéutica en la lesión vascular inducida por anticalcineurínicos.
- 4) La nanomedicina QM56 inhibe la señalización y efectos proinflamatorios mediados por TLR4 y podría utilizarse para evitar la lesión vascular y renal mediada por este receptor.
- 5) El bloqueo de CCL20 potencia la inflamación renal inducida por CsA *in vivo*, y acelera la fibrosis intersticial, sugiriendo que CCL20 podría jugar un papel adaptativo que resulta insuficiente para evitar el daño.

Bibliografía

1. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. 2010;140(6):771–6.
2. Trostel J, Garcia GE, Trostel J, Garcia GE. Endogenous Inhibitors of Kidney Inflammation. *J Nephrol Res*. 2015;1(2):61–8.
3. Kinsey G, Li L, Okusa M. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2009;109(4):1–7.
4. Vincent IS, Okusa MD. Biology of renal recovery: Molecules, mechanisms, and pathways. *Nephron Clin Pr*. 2014;127(1–4):10–4.
5. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2015;7(12):684–96.
6. Bonventre J, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4210–21.
7. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediat Inflamm*. 2009;
8. Jang HR, Rabb H. Immune cells in experimental acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. Nature Publishing Group; 2015;11(2):88–101.
9. Smith PL, Buffington DA, Humes HD. Kidney Epithelial Cells. *Methods Enzymol*. 2006. p. 194–207.
10. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. Nature Publishing Group; 2014;10(9):493–503.
11. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: Role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int*. 2004;66(2):496–9.
12. Fu J, Lee K, Chuang PY, Liu Z, He JC. Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2015;308(4):F287–97.
13. Fernández-Laso V, Sastre C, Valdivielso JM, Betriu A, Fernández E, Egido J, et al. Soluble TWEAK and Major Adverse Cardiovascular Events in Patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(3):413–22.
14. Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Fernandez-Fernandez B, Elewa U, Sanchez-Niño MD, Carrero JJ, et al. CXCL16 in kidney and cardiovascular injury. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(3):317–25.
15. Fernando M, Peakay PW, Endre ZH. Biomarkers of calcineurin inhibitor nephrotoxicity in transplantation. *Biomark Med*. 2014;8(10):1247–62.
16. Naesens M, Kuypers DRJ, Minnie S. Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:481–508.
17. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;1(4):3.
18. De Haij S, Daha MR, Van Kooten C. Mechanism of steroid action in renal epithelial cells. *Kidney Int*. 2004;65(5):1577–88.

19. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol.* 2007;123(1):7–13.
20. Cantaluppi V, Quercia AD, Dellepiane S, Ferrario S, Camussi G, Biancone L. Interaction between systemic inflammation and renal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transpl.* 2014;29(11):2004–11.
21. Gonçalves GM, Castoldi A, Braga TT, Câmara NOS. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand J Immunol.* 2011;73(5):428–35.
22. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2007;19(1):24–32.
23. Yiu WH, Lin M, Tang SCW. Toll-like receptor activation: from renal inflammation to fibrosis. *Kidney Int. Nature Publishing Group;* 2014;4(1):20–5.
24. Chen J, John R, Richardson J a, Shelton JM, Zhou XJ, Wang Y, et al. Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int. Nature Publishing Group;* 2012;79(3):288–99.
25. Ma J, Chadban SJ, Zhao CY, Chen X, Kwan T, Panchapakesan U, et al. TLR4 activation promotes podocyte injury and interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *PLoS One.* 2014;9(5):e97985.
26. Wang S, Schmaderer C, Kiss E, Schmidt C, Bonrouhi M, Porubsky S, et al. Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling. *Dis Model Mech.* 2010;3(1–2):92–103.
27. Furuichi K, Kaneko S, Wada T. Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2009;13(1):9–14.
28. Zoja C, Bautista Garcia P, Remuzzi G. The role of chemokines in progressive renal disease. *Front Biosci.* 2009;1(5):1815–22.
29. Van Kooten C, Daha MR, Van Es L. Tubular epithelial cells: A critical cell type in the regulation of renal inflammatory processes. *Exp Nephrol.* 1999;7(5–6):429–37.
30. Chung ACK, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(5):802–9.
31. Anders HJ, Vielhauer V, Schlondorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int.* 2003;63(2):401–15.
32. Moreno JA, Moreno S, Rubio-navarro A, Gómez-guerrero C, Ortiz A, Egido J. Role of chemokines in proteinuric kidney disorders. *Expert Rev Mol Med.* 2014;17(16):e3.
33. Moreno JA, Moreno S, Rubio-Navarro A, Sastre C, Blanco-Colio LM, Gómez-Guerrero C, et al. Targeting chemokines in proteinuria-induced renal disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16(8):833–45.
34. Sörensen I, Rong S, Susnik N, Gueler F, Shushakova N, Albrecht M, et al. B β 15 – 42 Attenuates the Effect of Ischemia-Reperfusion Injury in Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2011;1887–96.
35. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA. Inter cellular Adhesion Molecule-

- 1 – deficient Mice Are Protected against Ischemic Renal Injury. *J Clin Invest.* 1996;97(4):1056–63.
36. Imig JD, Ryan MJ. Immune and Inflammatory Role in Renal Disease. *Compr Physiol.* 2014;3(2):957–76.
37. Cao Q, David C. H. H, Yiping W. Macrophages in Kidney Injury, Inflammation, and Fibrosis. *Physiology.* 2015;30(3):183–94.
38. Rogers N, Ferenbach D, Isenberg J, Thomson A, Hughes J. Dendritic cells and macrophages in the kidney : a spectrum of good and evil. *Nat Rev Nephrol.* 2016;10(11):625–43.
39. Snelgrove SL, Kausman JY, Lo C, Lo C, Ooi JD, Coates PT, et al. Renal dendritic cells adopt a pro-inflammatory phenotype in obstructive uropathy to activate T cells but do not directly contribute to fibrosis. *Am J Pathol.* 2012;180(1):91–103.
40. Lu L, Faubel S, He Z, Andres Hernando A, Jani A, Kedl R, et al. Depletion of macrophages and dendritic cells in ischemic acute kidney injury. *Am J Nephrol.* 2012;35(2):181–90.
41. Kitching AR, Holdsworth SR. The Emergence of Th17 Cells as Effectors of Renal Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):235–8.
42. Turner J, Paust H, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int. Nature Publishing Group;* 2010;77:1070–5.
43. Kinsey GR, Sharma R, Okusa MD. Regulatory T cells in AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(11):1720–6.
44. Turner, Paust H-J, Steinmetz OM, Peters A, Riedel J-H, Erhardt A, et al. CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(6):974–85.
45. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr Physiol.* 2014;2(2):1303–53.
46. de Borst MH, Prakash J, Sandovici M, Klok P a, Hamming I, Kok RJ, et al. c-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulo-interstitial inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331(3):896–905.
47. Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U. HMGB1 Contributes to Kidney Ischemia Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2010;1878–90.
48. Lin Q, Chen Y, Lv J, Zhang H, Tang J, Gunaratnam L, et al. Kidney injury molecule-1 expression in IgA nephropathy and its correlation with hypoxia and tubulointerstitial inflammation. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2014;306(8):F885-95.
49. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. *Am J Kidney Dis.* 2008;52(3):595–605.
50. Mishra J. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(10):2534–43.
51. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ortiz A. TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney Int.* 2011;80(7):708–18.

52. Sanz AB, Ruiz-Andres O, Sanchez-Niño MD, Ruiz-Ortega M, Ramos AM, Ortiz A. Out of the TWEAKlight: Elucidating the Role of Fn14 and TWEAK in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol.* Elsevier; 2016;36(3):189–98.
53. Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, Carrasco S, Cannata-Ortiz P, Sanchez-Nino MD, et al. Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2016;1–12.
54. Xu Y, Ma H, Shao J, Wu J, Zhou L, Zhang Z, et al. A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(11):2647–58.
55. Yatim N, Jusforgues-saklani H, Orozco S, Schulz O, Barreira da Silva R, Reis e Sousa C, et al. RIPK1 and NF-κB signaling in dying cells determines crosspriming.pdf. *Science* (80-). 2016;350(6258):328–34.
56. Strutz F, Zeisberg M. Renal Fibroblasts and Myofibroblasts in Chronic Kidney Disease. *Front Immunol.* 2006;17:2992–8.
57. Campanholle G, Ligresti G, Gharib S a, Duffield JS. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304(7):C591-603.
58. Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, et al. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology;* 2004;165(1):237–46.
59. Rudemiller NP, Patel MB, Zhang J, Jeffs AD, Karlovich NS, Grif R. C-C Motif Chemokine 5 Attenuates Angiotensin II-Dependent Kidney Injury by Limiting Renal Macrophage Infiltration. *Am J Pathol.* 2016;
60. Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez R, Rodríguez JS, Rodrigues-Díez R, Rodríguez-Vita J, et al. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1513–26.
61. Rodrigues-Diez RR, Garcia-Redondo AB, Orejudo M, Rodrigues-Diez R, Briones AM, Bosch-Panadero E, et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor, through EGFR/Nox1 signaling, activates the NF-κB pathway and proinflammatory factors in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22(1):29–47.
62. Correa-Costa M, Braga TT, Semedo P, Hayashida CY, Bechara LRG, Elias RM, et al. Pivotal role of toll-like receptors 2 and 4, its adaptor molecule MyD88, and inflammasome complex in experimental tubule-interstitial nephritis. *PLoS One.* 2011;6(12):e29004.
63. Pulskens WP, Rampanelli E, Teske GJ, Butter LM, Claessen N, Luirink IK, et al. TLR4 promotes fibrosis but attenuates tubular damage in progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1299–308.
64. Sureshbabu A, Muhsin SA, Choi ME. TGF-β signaling in the kidney : profibrotic and protective effects. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2016;10065:596–606.
65. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2013;18(7):1028–40.

66. Bonventre J V. Maladaptive proximal tubule repair: Cell cycle arrest. *Nephron - Clin Pract.* 2014;127(1–4):61–4.
67. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah J V, Bonventre J V. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med.* 2012;100(2):130–4.
68. Zuk A, Bonventre J V. Acute Kidney Injury. *Am J Kidney Dis.* 2014;63(1):e95–106.
69. Gorin Y. The Kidney: An organ in the front line of oxidative stress-associated pathologies. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(12):639–41.
70. Bouvier N, Flinois JP, Gilleron J, Sauvage F-L, Legendre C, Beaune P, et al. Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(1):F160–9.
71. Lugin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem.* 2014;395(2):203–30.
72. Sureshbabu A, Ryter SW, Choi ME. Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury. *Redox Biol. Elsevier;* 2015;4:208–14.
73. Neria F, Castilla M a, Sanchez RF, Gonzalez Pacheco FR, Deudero JJP, Calabia O, et al. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int. Elsevier Masson SAS;* 2009;75(2):227–34.
74. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzym.* 2011;490:71–92.
75. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Publ Gr.* 2007;8(7):519–29.
76. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group;* 2013;12(9):703–19.
77. Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The Unfolded Protein Response: integratin stress signals through the stress senso IRE1 α . *Physiol Rev.* 2011;91(4):1219–43.
78. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6? and XBP1. *Dev Cell.* 2007;13(3):365–76.
79. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell.* 2001;107:881–91.
80. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2002;16(4):452–66.
81. Taniguchi M, Yoshida H. Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(4):345–50.
82. Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(2):F323–34.

83. Pallet N, Bouvier N, Legendre G, Gilleron J, Codogno P, Beaune P, et al. Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy*. 2008;4(6):783–91.
84. Du S, Nobuhiko H, Kunihiro H, Ayumi Kasai, Maro Okamura, Tao Huang, Jian Yao, Masayuki Takeda, Isao Araki, Norifumi Sawada, Adrienne W. Paton JCP and M, Kitamura. Suppression of NF- κ B by Cyclosporin A and Tacrolimus (FK506) via Induction of the C/EBP Family: Implication for Unfolded Protein Response. *J Immunol*. 2010;182:7201–11.
85. Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Vandenabeele P, Krysko D V., Agostinis P. ER stress-induced inflammation: Does it aid or impede disease progression? *Trends Mol Med*. Elsevier Ltd; 2012;18(10):589–98.
86. Gotoh T, Endo M, Oike Y. Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases. *Int J Inflam*. 2011;
87. Zhang K, J.Kaufman R. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454(7203):455–62.
88. Lim BJ, Hong SW, Jeong HJ. Renal tubular expression of Toll-like receptor 4 in cyclosporine nephrotoxicity. *Apmis*. 2009;117(8):583–91.
89. Lim SW, Li C, Ahn KO, Kim J, Moon IS, Ahn C. Cyclosporine-Induced Renal Injury Induces Toll-like Receptor and Maturation of Dendritic cells. *Tranplantation*. 2005;80(5):691–9.
90. González-Guerrero C, Ocaña-Salceda C, Berzal S, Carrasco S, Fernández-Fernández B, Cannata-Ortiz P, et al. Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF- κ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. Elsevier Inc.; 2013;272(3):825–41.
91. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*. 2005;78:1–8.
92. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol*. 2013;93(6):865–73.
93. Sorensen I, Rong S, Susnik N, Gueler F, Shushakova N, Albrecht M, et al. B 15-42 Attenuates the Effect of Ischemia-Reperfusion Injury in Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1887–96.
94. Valantine H. Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: risk factors and management. *J Hear Lung Transpl*. 2004;23:S187–93.
95. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Widemann A, Arnaud L, Loundou A, et al. Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am J Transpl*. 2008;8(11):2360–7.
96. Fougeray S, Bouvier N, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, Thervet E, et al. Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Dis*. Nature Publishing Group; 2011;2(4):e143.
97. Ucero, Berzal S, Ocaña-Salceda C, Sancho M, Orzáez M, Messeguer A, et al. A Polymeric Nanomedicine Diminishes Inflammatory Events in Renal Tubular Cells. *PLoS One*. 2013;8(1).

98. Ma FY, Tesch GH, Ozols E, Xie M, Schneider MD, Nikolic-Paterson DJ. TGF- β 1-activated kinase-1 regulates inflammation and fibrosis in the obstructed kidney. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2011;300(6):F1410–21.
99. Kazanietz MG. Novel “Nonkinase” Phorbol Ester Receptors: The C1 Domain Connection. *Mol Pharmacol*. 2002;61(4):759–67.
100. Welsh-Bacic D, Lindenmeyer M, Cohen CD, Draganovici D, Mandelbaum J, Edenhofer I, et al. Expression of the chemokine receptor CCR6 in human renal inflammation. *Nephrol Dial Transpl*. 2011;26(4):1211–20.
101. Woltman AM, De Fijter JW, Van Der Kooij SW, Jie KE, Massacrier C, Caux C, et al. MIP-3 α /CCL20 in renal transplantation and its possible involvement as dendritic cell chemoattractant in allograft rejection. *Am J Transpl*. 2005;5(9):2114–25.
102. Liptak P, Ivanyi B. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pr Nephrol*. 2006;2(7):398–404.
103. Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: a review. *J Transpl*. 2012;2012:230386.
104. Guillén-Gómez E, Dasilva I, Silva I, Arce Y, Facundo C, Ars E, et al. Early Macrophage Infiltration and Sustained Inflammation in Kidneys From Deceased Donors Are Associated With Long-Term Renal Function. *Am J Transpl*. 2016;
105. García del Moral R, Andújar M, O`Valle F. Mecanismos de nefrotoxicidad por ciclosporina A a nivel celular. *Nefrología*. 1995;15(1):55–60.
106. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehemann K, Wesselborg S. Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology*. 1997;198(1–3):35–49.
107. Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Guido M, Peng B, Uwagawa T, et al. NF-kB and AP-1 Connection: Mechanism of NF-B-Dependent Regulation of AP-1 Activity. *Mol Cell Biol*. 2004;24(17):7806–19.
108. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(1):11–9.
109. Sanz, Sanchez MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-ortega M, et al. NF- kB in Renal Inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;1254–62.
110. Kanellis J, Ma FY, Kandane-Rathnayake R, Dowling JP, Polkinghorne KR, Bennett BL, et al. JNK signalling in human and experimental renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transpl*. 2010;25(9):2898–908.
111. Francescato HDC, Costa RS, Júnior FB, Coimbra TM. Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. *Nephrol Dial Transpl*. 2007;22(8):2138–48.
112. Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, Akira S, Reeves WB. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(5):923–32.
113. Okugawa S, Ota Y, Kitazawa T, Nakayama K, Yanagimoto S, Tsukada K, et al. Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(2):C399–408.
114. Lee JJ, Kim DH, Kim DG, Lee HJ, Min W, Rhee MH, et al. Toll-like receptor 4-linked janus kinase

2 signaling contributes to Internalization of *Brucella abortus* by macrophages. *Infect Immun.* 2013;81(7):2448–58.

115. Zhang X, Dong H, Zhang S, Lu S, Sun J, Qian Y. Enhancement of LPS-induced microglial inflammation response via TLR4 under high glucose conditions. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35(4):1571–81.
116. Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Fernandez-Vizarra P, Mallavia B, Flores C, et al. Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(5):763–72.
117. Koike K, Ueda S, Yamagishi S, Yasukawa H, Kaida Y, Yokoro M, et al. Protective role of JAK/STAT signaling against renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *Clin Immunol.* Elsevier Inc.; 2014;150(1):78–87.
118. Rodrigues-Diez R, González-Guerrero C, Ocaña-Salceda C, Rodrigues-Diez RR, Egido J, Ortiz A, et al. Calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus induce vascular inflammation and endothelial activation through TLR4 signaling. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2016;6(May):27915.
119. O 'shea JJ, Holland SM, Staudt LM. Mechanisms of Disease JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer. *N Engl J Med.* 2013;368:161–70.
120. Berzal S, González-Guerrero C, Rayego-Mateos S, Ucero A, Ocaña C, Egido J, et al. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) regulates junctional proteins in tubular epithelial cells via canonical NF-κB pathway and ERK activation. *J Cell Physiol.* 2015;230(7):1580–93.
121. Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niñ MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kreztler M, et al. The Cytokine TWEAK Modulates Renal Tubulointerstitial Inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2008;695–703.
122. Sanchez-Niño MD, Poveda J, Sanz AB, Mezzano S, Carrasco S, Fernandez-Fernandez B, et al. Fn14 in podocytes and proteinuric kidney disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2232–43.
123. Ucero AC, Benito-Martin A, Fuentes-Calvo I, Santamaria B, Blanco J, Lopez-Novoa J, et al. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes kidney fibrosis and Ras-dependent proliferation of cultured renal fibroblast. *Biochim Biophys Acta.* Elsevier B.V.; 2013;1832(10):1744–55.
124. Justo P, Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Winkles JA, Lorz C, Egido J, et al. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: The role of TWEAK. *Kidney Int.* 2006;70(0085–2538 (Print)):1750–8.
125. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, et al. Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: A role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J Cell Mol Med.* 2009;13(9 B):3329–42.
126. Campbell M, Hile K, Zhang H. Toll-like receptor 4: a novel signaling pathway during renal fibrogenesis. *J Surg Res.* 2011;168(1):1–16.
127. El-achkar TM, Huang X, Plotkin Z, Sandoval RM, Rhodes GJ, Dagher PC, et al. Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll-like receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2006;290:1034–43.

128. Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin invest.* 2013;123(2):540–1.
129. Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci.* 2007;112:375–84.
130. Trapp A, Weis M. The impact of immunosuppression on endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45(1):81–7.
131. Markovic S, Raab M, Daxecker H. In vitro effects of cyclosporin A on the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. *Clini chim acta.* 2002;316(1–2):25–31.
132. Rafiee P, Johnson CP, Li MS, Ogawa H, Heidemann J, Fisher PJ, et al. Cyclosporine A enhances leukocyte binding by human intestinal microvascular endothelial cells through inhibition of p38 MAPK and iNOS: Paradoxical proinflammatory effect on the microvascular endothelium. *J Biol Chem.* 2002;277(38):35605–15.
133. Badiwala M V., Guha D, Tumati L, Joseph J, Ghashghai A, Ross HJ, et al. Epidermal growth factor-like domain 7 is a novel inhibitor of neutrophil adhesion to coronary artery endothelial cells injured by calcineurin inhibition. *Circulation.* 2011;124(11 SUPPL. 1).
134. Zhao H, Perez JS, Lu K, George AJT, Ma D. Role of Toll-like receptor-4 in renal graft ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2014;306(8):F801-11.
135. Saito T, Sadoshima J. Toll-like receptor 4 inhibition reduces vascular inflammation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2016;116(8):1477–90.
136. Raina A, Horn ET, Benza RL. The pathophysiology of endothelin in complications after solid organ transplantation: a potential novel therapeutic role for endothelin receptor antagonists. *Transplantation.* 2012;94(9):885–93.
137. Van der Heiden K, Cuhlmann S, Luong L a, Zakkar M, Evans PC. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin Sci.* 2010;118:593–605.
138. Martin-Ventura J, Banco-Colio L, Gomez-Hernandez A. Intensive Treatment With Atorvastatin Reduces Inflammation in Mononuclear Cells and Human Atherosclerotic Lesions in One Month. *Stroke.* 2013;53(9):1689–99.
139. Lopez-Franco O, Hernandez-vargas P, Ortiz-Muñoz G. Parthenolide Modulates the NF- B-Mediated Inflammatory Responses in Experimental Atherosclerosis. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1864–70.
140. Redondo-Horcajo M, Lamas S. Oxidative and nitrosative stress in kidney disease: a case for cyclosporine A. *J Nephrol.* 2005;18(4):453–7.
141. Damiano S, Ciarcia R, Montagnaro S, Pagnini U, Garofano T, Capasso G, et al. Prevention of Nephrotoxicity Induced by Cyclosporine-A: Role of Antioxidants. *J Cell Biochem.* 2015;116(3):364–9.
142. De Batista PR, Palacios R, Martín A, Hernanz R, Médici CT, Silva MASC, et al. Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS One.* 2014;9(8).
143. Young KC, Hussein SM, Dadiz R, DeMello D, Devia C, Hehre D, et al. Toll-like receptor 4-

deficient mice are resistant to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Exp Lung Res.* 2010;36(2):111–9.

144. Dange RB, Agarwal D, Masson GS, Vila J, Wilson B, Nair A, et al. Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res.* 2014;103(1):17–27.
145. Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(7):931–5.
146. Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A, Niwa M. ER Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK. *PLoS One.* 2012;7(10).
147. Cheng CH, Shu KH, Chang HR, Chou MC. Cyclosporine-induced tubular vacuolization: The role of bip/Grp78. *Nephron Exp Nephrol.* 2013;122(1–2):1–12.
148. Sarró E, Jacobs-cachá C, Itarte E, Meseguer A. A pharmacologically-based array to identify targets of cyclosporine A-induced toxicity in cultured renal proximal tubule cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* Elsevier Inc.; 2012;258(2):275–87.
149. Dong B, Zhou H, Han C, Yao J, Xu L, Zhang M, et al. Ischemia/reperfusion-induced chop expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: The role of acidosis and gpr4 e110944. *PLoS One.* 2014;9(10):1–11.
150. Noh MR, Kim JI, Han SJ, Lee TJ, Park KM. C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Biochim Biophys Acta.* Elsevier B.V.; 2015;1852(9):1895–901.
151. Zhang M, Guo Y, Fu H, Pan J, Wang Y, Cheng J, et al. Chop deficiency prevents UUO-induced renal fibrosis by attenuating fibrotic signals originated from Hmgb1 TLR4 NF κ B IL-1 β signaling. *Cell Death Dis.* 2015;6(e1847).
152. Choi YM, Cho HY, Anwar MA, Kim HK, Kwon JW, Choi S. ATF3 attenuates cyclosporin A-induced nephrotoxicity by downregulating CHOP in HK-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448(2):182–8.
153. Gonçalves S, Fernandez-Sanchez R, Sanchez-Niño MD, Tejedor A, Neria F, Egido J, et al. Tyrphostins as potential therapeutic agents for acute kidney injury. *Curr Med Chem.* 2010;17(10):974–86.
154. Leon CG, Tory R, Jia J, Sivak O, Wasan KM. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: A new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharm Res.* 2008;25(8):1751–61.
155. Savva A, Roger T. Targeting Toll-like receptors: Promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol.* 2013;4(NOV):1–16.
156. Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Laterre PF. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediat Inflamm.* 2010;2010.
157. Lin M, Yiu WH, Li RX, Wu HJ, Wong DWL, Chan LYY, et al. The TLR4 antagonist CRX-526 protects against advanced diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2013;83(5):887–900.

158. Neal MD, Jia H, Eyer B, Good M, Guerriero CJ, Sodhi CP, et al. Discovery and Validation of a New Class of Small Molecule Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Inhibitors. *PLoS One*. 2013;8(6).
159. Fan H, Qi D, Yu C, Zhao F, Liu T, Zhang Z. Paeonol protects endotoxin-induced acute kidney injury : potential mechanism of inhibiting TLR4-NF- κ B signal pathway. *Oncotarget*. 2016;7(26).
160. Miura K, Sahara H, Sekijima M, Kawai A, Waki S, Nishimura H, et al. Protective effect of neutralization of the extracellular high-mobility group box 1 on renal ischemia-reperfusion injury in miniature swine. *Transplantation*. 2014;98(9):937–43.
161. Lau A, Wang S, Liu W, Haig A, Zhang ZX, Jevnikar AM. Glycyrrhizic acid ameliorates HMGB1-mediated cell death and inflammation after renal ischemia reperfusion injury. *Am J Nephrol*. 2014;40(1):84–95.
162. Madrigal-Carballo S, Porras G, Esquivel M, Sibaja M, Tamborero S, Vicent MJ. Conjugados poliméricos y su utilización como nanomedicinas anticancerígenas. *Rev Iberoam Polímeros*. 2008;8(5):374–90.
163. Schutyser E, Struyf S, Damme J Van. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:409–26.
164. Turner, Paust H-J, Steinmetz OM, Peters A, Riedel J-H, Erhardt A, et al. CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(6):974–85.
165. Huang C, Pollock CA, Chen XM. High glucose induces CCL20 in proximal tubular cells via activation of the KCa3.1 channel. *PLoS One*. 2014;9(4):1–8.
166. Katchar K, Kelly CP, Keates S, O'brien MJ, Keates AC. MIP-3 α neutralizing monoclonal antibody protects against TNBS-induced colonic injury and inflammation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(5):G1263–71.
167. Affò S, Ibanez-Morales O, Rodrigo-Torres D, Altamirano J, Blaya D, Dapito D, et al. CCL20 mediates lipopolysaccharide induced liver injury and is a potential driver of inflammation and fibrosis in alcoholic hepatitis. *Gut*. 2014;100(2):130–4.
168. Chan AJ, Alikhan MA, Odobasic D, Gan PY, Khouri MB, Steinmetz OM, et al. Innate IL-17A-producing leukocytes promote acute kidney injury via inflammasome and toll-like receptor activation. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2014;184(5):1411–8.
169. Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177(2):840–51.
170. Pabbisetty SK, Rabacal W, Volanakis EJ, Parekh V V, Olivares-villagómez D, Cendron D, et al. Peripheral tolerance can be modified by altering KLF2-regulated Treg migration. *PNAS*. 2016;1–9.
171. Wu T, Zhang L, Xu K, Sun C, Lei T, Peng J, et al. Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells during immune response in vivo. *Transpl Immunol*. 2012;27(1):30–8.
172. Miroux C, Morales O, Ghazal K, Othman S, de Launoit Y, Pancré V, et al. In vitro effects of

cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation*. 2012;94:123–31.

173. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):180–90.
174. Vaeth M, Schliesser U, Muller G, Reissig S, Satoh K, Tuettenberg a., et al. Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(40):16258–63.
175. Lee H, Nho D, Chung H-S, Lee H, Shin M-K, Kim S-H, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Kidney Int*. 2010;78(11):1100–9.
176. Kim H, Lee H, Lee G, Jang H, Kim SS, Yoon H, et al. Phospholipase A2 inhibits cisplatin-induced acute kidney injury by modulating regulatory T cells by the CD206 mannose receptor. *Kidney Int*. Nature Publishing Group; 2015;88(3):550–9.
177. NCT01712061. A Phase 2 Multi-Center Study To Evaluate The Efficacy And Safety Of A Chemokine CCR2/5 Receptor Antagonist In Adults With Type 2 Diabetes And Overt Nephropathy. Disponible en <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT01712061&Search=Search>. [Último acceso Diciembre 2016].
178. NCT00633477. Efficacy and Safety of Resatorvid in Patients With Sepsis-induced Cardiovascular and Respiratory Failure. Disponible en <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT00633477&Search=Search>. [Último acceso Diciembre 2016].
179. NCT02267317. The Effect of TLR4 Inhibition in Obese and Type 2 Diabetic Subjects. Disponible en <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT02267317&Search=Search>. [Último acceso Diciembre 2016].
180. NCT02321111. The Role of TLR4 on Lipid-induced Insulin Resistance. Disponible en <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT02321111&Search=Search>. [Último acceso Diciembre 2016].
181. NCT01808469. First in Human Study of an Anti-Toll-like Receptor 4 (TLR4) Monoclonal Antibody (NI-0101) in Adult Healthy Volunteers. Disponible en <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT01808469&Search=Search>. [Último acceso Diciembre 2016].
182. NCT01794663. Placebo-Controlled Study to Evaluate the Safety and Efficacy of OPN-305 in Preventing Delayed Renal Graft Function. Disponible en <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT01794663&Search=Search>. [Último acceso Diciembre 2016].

ANEXO. A

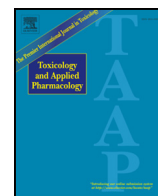
Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- **González-Guerrero C**, Ocaña-Salceda C, Berzal S, Carrasco S, Fernández-Fernández B, Cannata-Ortiz P, Egido J, Ortiz A, Ramos AM. Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF- κ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Nov 1;272(3):825-41. PMID: 23958496.
- Rodríguez-Diez R, **González-Guerrero C**, Ocaña-Salceda C, Rodríguez-Diez RR, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Ramos AM. Calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus induce vascular inflammation and endothelial activation through TLR4 signaling. *Scie Rep*. 2016 Jun 13; 6:27915. PMID: 27295076.
- **González-Guerrero C**, Cannata-Ortiz P, Guerri C, Egido J, Ortiz A, Ramos AM. TLR4-mediated inflammation is a key pathogenic event leading to kidney damage and fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Arch Toxicol*. 2016 Sep 1 (Epub ahead of print).

Otras publicaciones conseguidas durante el desarrollo de esta tesis:

- Berzal S, **González-Guerrero C**, Rayego-Mateos S, Uceró Á, Ocaña-Salceda C, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Ramos AM. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) regulates junctional proteins in tubular epithelial cells via canonical NF- κ B pathway and ERK activation. *J Cell Physiol*. 2015 Jul;230(7):1580-93. PMID: 25536182.
- Ramos AM, **González-Guerrero C**, Sanz A, Sánchez-Niño MD, Rodríguez-Orsorio L, Martín-Cleary C, Fernández-Fernández B, Ruiz-Ortega M, Ortiz A. Designing drugs that combat kidney damage. *Expert Opin Drug Discov*. 2015 May;10(5):541-56. PMID: 25840605.

ANEXO. B



Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF- κ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells

Cristian González-Guerrero^{a,1}, Carlos Ocaña-Salceda^{a,1}, Sergio Berzal^a, Susana Carrasco^a, Beatriz Fernández-Fernández^b, Pablo Cannata-Ortiz^c, Jesús Egido^{a,d,e}, Alberto Ortiz^{a,d,e}, Adrián M. Ramos^{a,*}

^a Renal and Vascular Pathology Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

^b Nephrology, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

^c Department of Pathology, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

^d Renal and Vascular Pathology Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD)/Universidad Autónoma de Madrid, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

^e Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT-IRSIN), C/ José Abascal, 42, 1ª izda, 28003 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2013

Revised 8 August 2013

Accepted 9 August 2013

Available online 17 August 2013

Keywords:

Calcineurin inhibitors

Cyclosporine

Tacrolimus

Inflammation

Nephrotoxicity

NF- κ B

ABSTRACT

The calcineurin inhibitors (CNIs) cyclosporine (CsA) and tacrolimus are key drugs in current immunosuppressive regimes for solid organ transplantation. However, they are nephrotoxic and promote death and profibrotic responses in tubular cells. Moreover, renal inflammation is observed in CNI nephrotoxicity but the mechanisms are poorly understood. We have now studied molecular pathways leading to inflammation elicited by the CNIs in cultured and kidney tubular cells.

Both CsA and tacrolimus elicited a proinflammatory response in tubular cells as evidenced by a transcriptomics approach. Transcriptomics also suggested several potential pathways leading to expression of proinflammatory genes. Validation and functional studies disclosed that in tubular cells, CNIs activated protein kinases such as the JAK2/STAT3 and TAK1/JNK/AP-1 pathways, TLR4/Myd88/IRAK signaling and the Unfolded Protein Response (UPR) to promote NF- κ B activation and proinflammatory gene expression. CNIs also activated an Nrf2/HO-1-dependent compensatory response and the Nrf2 activator sulforaphane inhibited JAK2 and JNK activation and inflammation. A murine model of CsA nephrotoxicity corroborated activation of the proinflammatory pathways identified in cell cultures. Human CNIs nephrotoxicity was also associated with NF- κ B, STAT3 and IRE1 α activation.

In conclusion, CNIs recruit several intracellular pathways leading to previously non-described proinflammatory actions in renal tubular cells. Identification of these pathways provides novel clues for therapeutic intervention to limit CNIs nephrotoxicity.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Calcineurin inhibitors (CNIs) are key drugs in current immunosuppressive regimes for solid organ transplantation. However, both cyclosporine A (CsA) and tacrolimus (formerly known as FK506) are toxic drugs that may cause acute and chronic nephrotoxicity (Naesens et al., 2009). The three key biological processes underlying acute and chronic CNIs nephrotoxicity are kidney cell death, inflammation and residual fibrosis. In acute kidney injury, fibrosis is only evident in later stages

when kidney regeneration fails to fully restore kidney structure and function. A body of evidence has shown that CsA and tacrolimus promote tubular cell death and pro-fibrotic changes in tubular cells, including epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Berzal et al., 2012; Justo et al., 2003; Neria et al., 2009). However, there is very little information on the effects of CNIs on kidney inflammation, despite the fact that inflammation plays a key role in nephrotoxic kidney injury induced by some drugs and has been observed in CNIs nephrotoxicity. Specifically, the cisplatin-elicited inflammatory response in tubular cells plays a key amplification role in cisplatin nephrotoxicity (Pabla and Dong, 2008).

Inflammation is an essential event in the progression of renal disease. The transcription factor NF- κ B is a key promoter of renal inflammation that integrates intracellular signals from many stimuli and drives the expression of cytokines and chemokines (Sanz et al., 2008). NF- κ B contributes to lymphocyte activation following recruitment by the calcineurin/NFAT signaling pathway. CsA and tacrolimus inhibit

* Corresponding author at: Laboratorio de Patología Renal y Vascular (Investigación, 4ª planta), Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, Madrid 28040, Spain. Fax: +34 915 442636.

E-mail addresses: cristian.gonzalez@fjd.es (C. González-Guerrero), carlos.ocana@fjd.es (C. Ocaña-Salceda), sberzal@fjd.es (S. Berzal), scarrasco@fjd.es (S. Carrasco), bfernandez@fjd.es (B. Fernández-Fernández), pablo.cannata@fjd.es (P. Cannata-Ortiz), jegido@fjd.es (J. Egido), aortiz@fjd.es (A. Ortiz), amramos@fjd.es (A.M. Ramos).

¹ These authors contributed equally to this work.

calcineurin in lymphocytes, thus hindering the formation of cooperative NFAT, NF- κ B and AP-1 complexes and hence, NF- κ B-dependent IL-2 and IL-8 production and clonal T cell expansion (Graneli-Piperno et al., 1990; Nishiyama et al., 2005). This antiinflammatory effect of CNIs in lymphocytes contrasts to tubulointerstitial inflammation observed in animals chronically treated with CsA (Ling et al., 2003; Mizui et al., 2004) or in those with deletion of the α isoform of calcineurin A (Gooch et al., 2007). However, the molecular mechanisms of kidney inflammation in response to CNIs have not been studied and it is unknown whether CNIs have direct pro-inflammatory actions on renal cells. The response of tubular cells and leukocytes to CNIs may differ. Thus, CsA promotes cell death in tubular cells but protects from cell death in macrophages (Hortelano et al., 1999, 2000).

Numerous molecules and signaling pathways contribute to CNIs toxicity. Thus, CNIs elicit mitochondrial injury, endoplasmic reticulum (ER) stress and activate protein kinases (including MAPK and JAK/STAT) and caspase cascades to produce apoptosis (Justo et al., 2003; Neria et al., 2009; Xiao et al., 2013). However, whereas some of these pathways are also able to recruit NF- κ B and elicit inflammation in other cellular systems or in tubular cells exposed to other stressors, their role in the generation of inflammation in CNIs nephrotoxicity has not been addressed.

The Unfolded Protein Response (UPR) is an ancient physiological adaptive mechanism to cope with potential deleterious protein misfolding in the ER. CsA- and tacrolimus-induced synthesis of the UPR protein GADD153/CHOP restrained TNF α -elicited inflammation in tubular cells (Du et al., 2009). This antiinflammatory action of CNIs was proposed to potentially protect renal tissue after transplantation. However, the fact remains that CNIs contribute to chronic allograft nephropathy, a process characterized by tubulointerstitial inflammation. Innate immunity responses involving toll like receptors (TLR) may also lead to NF- κ B activation during infection as well as during sterile inflammation (Gonçalves et al., 2011; Loiarro et al., 2010). In this regard, increased TLR2 and TLR4 levels have also been observed in chronic human CsA nephrotoxicity (Lim et al., 2005, 2009). In resting macrophages, calcineurin may restrain TLR basal activity since CNIs favored TLR downstream signaling (Kang et al., 2007; Loiarro et al., 2010), but the interaction of CNIs with TLRs in kidney cells has not been explored.

Renal tubular cells compose most of the mass of the functioning kidney and they are thought to be a central cell type in renal inflammation and CNIs nephrotoxicity (Daha and van Kooten, 2000). We have now explored the hypothesis that CNIs trigger early proinflammatory signaling directly on tubular cells. We show that CNIs engage several protein kinase-dependent pathways that converge at and result in NF- κ B activation and hence in inflammation. Both the UPR and TLR natural immunity also contributed to NF- κ B activation.

Materials and methods

Cells and reagents. MCT cells are a cultured line of murine proximal tubular epithelial cells originally obtained from Eric Neilson (Vanderbilt University, Nashville, TN) that have been extensively characterized and used as model to study renal inflammation (Haverty et al., 1988; Sanz et al., 2008; Ucero et al., 2013). MCT proximal tubular epithelial cells were cultured in RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% decompartmented fetal bovine serum (DFBS), 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin, in 5% CO₂ at 37 °C (Berzal et al., 2012). Human kidney 2 (HK2) proximal tubular epithelial cell line was cultured in the same RPMI medium supplemented with Insulin–Transferrin–Sodium Selenite (100 μ g/ml) and hydrocortisone (5 ng/ml). Cells were depleted of DFBS and stimulated when 70–80% confluent. Endotoxin free CsA (Calbiochem, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) and tacrolimus (USBiological, Salem, MA) stock solutions (both 10 mg/ml) were dissolved in ethanol. Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) cells were grown in high glucose (4.5 g/l) DMEM with the same additives as RPMI. The following inhibitors (specificity indicated between brackets) were used at concentration derived from

prior dose–response studies in our lab or from the literature: AG490 (JAK2), SP600025 (JNK), (5Z)-7-Oxozeaenol (TAK1), IRAK1/4 inhibitor, 4 μ 8C (IRE1 α) and salubrinol (eIF-2 α) from Calbiochem; Pepin–Myd88 (Myd88) and CLI095 (TLR4) from Invivogen (San Diego, CA); IL-1Rn (IL-1R) from Abnova (Taipei, Taiwan); Parthenolide (Ik-B α), PBA (UPR) and 3-Ethoxy-5,6-dibromosalicylaldehyde (IRE1 α) from Sigma-Aldrich (Spain). Sulforaphane (SFN, Nrf2 activator) was obtained from Calbiochem.

Transcriptomics arrays. Transcriptomics arrays of MCT renal tubular cells were performed at Unidad Genómica Moncloa, Fundación Parque Científico de Madrid, Madrid, Spain. Affymetrix microarray analysis was performed following the manufacturer's protocol. Image files were initially obtained through Affymetrix GeneChip Command Console Software. Subsequently, Robust Multichip Analysis was performed using the Affymetrix Expression Console Software. Starting from the normalized Robust Multichip Analysis, the Significance Analysis of Microarrays was performed using the limma package (Babelomics, <http://www.babelomics.org>), using a false discovery rate of 5% for values increased for at least 1.5 times over the control to identify genes that were significantly differentially regulated between the analyzed groups. The analysis of concurrent annotations was performed with the web-based tool GENECODIS (Carmona-Saez et al., 2007).

Gene expression studies. One μ g RNA isolated by Tripure (Roche, Spain) was reverse transcribed with High Capacity cDNA Archive Kit and real-time PCR was performed on a ABI Prism 7500 PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the DeltaDelta Ct method. Expression levels are given as ratios to GAPDH. Pre-developed primer and probe assays were all from Applied.

Elisa. Cells were stimulated with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml tacrolimus, and murine MCP-1 was determined in the supernatants by ELISA (BD, Franklin Lakes, NJ) according to manufacturer's instructions. Briefly, 96 well plates were covered with anti MCP-1 capture antibody overnight at 4 °C, then incubated at RT with the samples properly diluted to fit the measuring linear range and finally with an HRP-conjugated anti MCP-1 secondary antibody. Signal was developed with the colorimetric TMB substrate reagent set (BD), stopped with 2 N sulfuric acid and read it at a wavelength of 450 nm. A wavelength of 570 nm was used to correct experimental intra-assay variations.

Western blot. Protein content from cell extracts homogenized in lysis buffer (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 0.1 mmol/L PMSF, 25 mmol/L NaF) was determined by the bicinchoninic acid method (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Proteins were separated by 10% SDS-PAGE under reducing conditions and then blotted onto nitrocellulose membranes. Membrane blockade was accomplished with 5% defatted milk in TBS-T (0.05 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.8). Thereafter, membranes were overnight probed at 4 °C with specific primary antibodies made in the same blocking solution or 5% BSA in TBS-T and then incubated with secondary HRP-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. Primary antibodies to p65, JAK2, CHOP, XBP1 and Nrf2 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); to p-p65 (Ser536), p-IkB α , IkB α , p-STAT3 (Ser727), STAT3, p-JNK, JNK, p-TAK1, TAK1, p-IRAK1 from Cell Signaling Technology (Danvers, MA); to p-JAK2 (pYpY1007-1008) from Invitrogen (Camarillo, CA); to p-IRE1 α (Abcam, Cambridge, UK); to IRE1 α from Lifespan Biosciences (Seattle, WA) and to HO-1 from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY). Antibodies to α -Tubulin (Sigma-Aldrich) and mouse polyclonal anti-GAPDH (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) were used to correct minor differences in protein loading.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Nuclei and cytosolic fractions from cell pellets were separated by using NE-PER[®] extraction

reagents (Thermo Scientific, Rockford, IL) and processed according to manufacturer's instructions. The protein concentration was determined by the bicinchoninic acid method (Pierce Biotechnology). Gel shift assays were performed as previously described (Sanz et al., 2008). The consensus oligonucleotide sequences employed were: 5'-AGTTGAGGG GACTTTCCAGGC-3' for NF- κ B and 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGAA-3' for AP-1.

Immunofluorescence. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS, permeabilized in 0.1% Triton X-100/PBS, washed in 1% BSA/PBS and blocked with 4% BSA/PBS. The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal anti-RelA (1:200) and XBP1 (1:300) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-p-STAT3-(Ser727)(1:100) (Cell Signaling Technology). Cells were incubated with Alexa secondary antibodies (Invitrogen) and nuclei counterstained with propidium iodide (PI) or DAPI. Cells were analyzed using a Confocal System TCS SP5 (Leica, Madrid, Spain).

Animal model. A previously described murine model of CsA nephrotoxicity (Neria et al., 2009) was reproduced in adult male 10 to 12-week old C57Bl/6 mice (Janvier, Saint Berthevin, France) to study the *in vivo* relevance of the cell culture results. Studies were conducted in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication Nu 85-23, revised 1996) and was approved by the institution's animal subject review committee. Emphasis was made in the humane care of the animals. CsA was first dissolved in ethanol (200 mg/ml) and then in olive oil. Groups ($n = 8$) were as follows: a) Healthy control (CsA vehicle) and b) CsA-treated (250 mg/kg/day, s.c). Mice were treated with the vehicle alone or CsA at the indicated doses, once a day for 5 consecutive days. After treatment, animals were killed. Blood was drawn for urea assessment and kidneys were perfused *in situ* with cold saline before removal. One kidney was snap-frozen in liquid nitrogen for protein and RNA studies and the other fixed and paraffin embedded for IHC staining.

Human biopsies. Human kidney biopsies were obtained from 4 patients with CNIs nephrotoxicity diagnosed on the base of pathological findings excluding acute and chronic rejection (3 male and 1 female, age range 27–67 years, serum creatinine 2.4 ± 1.4 mg/dl, 24 h urinary protein/creatinine excretion 0.2 ± 0.2 (g/g), 3 on CsA and 1 on tacrolimus, and time elapsed since transplantation 2.9 years). Nephrectomy specimen (adenoma) from a 76-year-old non-diabetic male with serum creatinine 0.9 mg/dl and no proteinuria was used as control. The study protocol was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained. Human renal biopsies were obtained from the IIS-Fundacion Jimenez Diaz biobank.

Immunohistochemistry. Paraffin-embedded sections were stained using standard histology procedures. Immunostaining was carried out in 2 μ m thick tissue sections that were deparaffinized and antigen retrieved using the PT Link system (Dako Diagnostics, Barcelona, Spain) with Sodium Citrate Buffer (10 mM) adjusted to pH 6. Immunohistochemical staining was performed using the Dako Autostainer (Dako Diagnostics). Briefly: endogenous peroxidase was blocked and then sections were incubated for 20–30 min at room temperature with primary antibody: rabbit polyclonal anti active caspase 3 (1/2500) (Promega, Madison, WI), p65 (1/500) (Santa Cruz) and IRE1 α (1/350) (Lifespan Biosciences); rabbit monoclonal anti STAT3 (1/500) (Cell Signaling) and rat polyclonal anti F4/80 (1/10,000) (AbD Serotec). After washing, slides were treated with the EnVision™ DuoFLEX Doublestain System (Dako Diagnostics) using 3,3'-diaminobenzidine as chromogen. Sections were counterstained with Carazzi's hematoxylin. Depending of each marker, the total number of stained tubules or cells was counted in 10 randomly chosen fields (200 \times) and the result expressed as the mean \pm SD of positive tubules or cells per field. Samples were examined in a blind manner.

Statistics. Statistical analysis was performed using SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL). Results are expressed as mean \pm SD. Significant differences at the $p < 0.05$ level were assessed by a non-parametric Mann-Whitney test for two independent samples comparing stimulated vs negative control (without treatment) group values and inhibited co-stimulated vs stimulated only group values. Experiments were repeated at least three times on different days.

Results

Transcriptomic analysis of inflammatory master regulatory genes and NF- κ B target genes in murine tubular cells treated with CNIs

To evaluate the potential of CNIs to elicit inflammatory responses in tubular cells and to search for relevant molecules that may contribute to CNIs-dependent inflammation, the transcriptome of murine MCT proximal tubular cells exposed to 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml tacrolimus for 6 h was analyzed. Several genes closely related to the NF- κ B pathway were found differentially expressed in cells treated with both CNIs for

Table 1

Transcriptome analysis of cultured tubular cells stimulated for 6 h with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml tacrolimus. Key inflammation-related gene expression.

Gene function/category	Gene symbol	CsA ^a	FDR CsA ^b	Tacrolimus ^a	FDR tacrolimus ^b
NF- κ B signaling pathway	<i>Bcl3</i> *	2.5	0.001	2.4	0.001
	<i>Nfkbie</i> *	2.5	0.012	2.2	0.022
	<i>Relb</i> *	2.3	0.004	2.3	0.003
	<i>Tnfaiip3</i>	2.0	0.022	1.3	n.s.
	<i>Nfkb2</i> *	1.9	0.007	2.0	0.003
	<i>Nfkb1</i> *	1.8	0.011	1.7	0.013
	<i>Nfkbia</i> *	1.8	0.027	1.4	n.s.
	<i>Camk1d</i>	1.7	0.247	2.7	0.025
	<i>Rhebl1</i>	1.5	0.054	1.8	0.007
	<i>Myc</i>	4.1	<0.001	3.9	<0.001
NF- κ B targets	<i>Vcam1</i>	3.1	0.001	3.4	0.001
	<i>Csf2</i>	2.9	0.007	2.2	0.030
	<i>Il1rn</i>	2.5	0.001	3.4	<0.001
	<i>Traf1</i>	2.3	0.041	2.0	n.s.
	<i>Csf1</i>	1.8	0.003	1.7	0.004
	<i>Icam1</i>	1.4	n.s.	1.7	0.022
	<i>Ccl20</i> *	20.5	0.013	13.5	0.020
Inflammatory cytokines and mediators	<i>Ccl2</i> *	10.6	0.002	11.6	0.002
	<i>Ccl5</i> *	6.8	<0.001	15.3	<0.001
	<i>Lif</i>	4.2	<0.001	3.2	<0.001
	<i>Ptgs2</i> *	4.1	<0.001	3.8	<0.001
	<i>Cxcl10</i> *	4.0	0.009	4.6	0.004
	<i>Ccl7</i> *	3.6	0.017	4.7	0.004
	<i>Ccr12</i> *	2.8	0.006	3.5	0.002
	<i>Il15ra</i> *	2.3	0.039	2.5	0.025
	<i>Cxcl11</i> *	2.0	n.s.	2.8	0.013
	<i>Serp1b9</i>	1.8	0.005	2.6	<0.001
	<i>Il17ra</i>	1.8	0.044	1.9	0.018
	<i>Csf1</i>	1.8	0.003	1.7	0.004
	<i>Camk1d</i>	1.7	n.s.	2.7	0.025
	<i>Cd74</i>	1.7	0.010	2.2	0.001
	<i>Maff</i>	4.5	0.002	3.7	0.003
AP-1 proteins	<i>Fosl1</i>	3.6	0.024	3.4	0.027
	<i>Junb</i> *	2.8	<0.001	2.0	0.002
	<i>Mafk</i> *	1.7	n.s.	1.9	0.029
	<i>Fos</i>	1.9	0.008	1.6	0.031
	<i>Ppp1r15a</i>	5.0	<0.001	6.1	<0.001
ER stress/UPR signaling	<i>Ddit3</i>	4.8	<0.001	6.1	<0.001
	<i>Trib3</i> *	4.2	0.001	5.0	0.001
	<i>Hmox1</i>	2.9	0.015	3.5	0.006
	<i>Atf6</i>	2.4	<0.001	2.5	<0.001
	<i>Phlda1</i>	2.3	0.004	1.6	0.036
	<i>Ero1l</i>	1.7	0.023	2.0	0.004
	<i>Atf4</i>	1.6	0.006	1.6	0.006
	<i>Herpud1</i>	1.8	0.008	1.6	0.015

n.s. Non-significant.

^a Rate of gene expression in fold-change vs control.

^b FDR (false discovery rate) indicates normalized p values.

* Indicates regulation by NF- κ B.

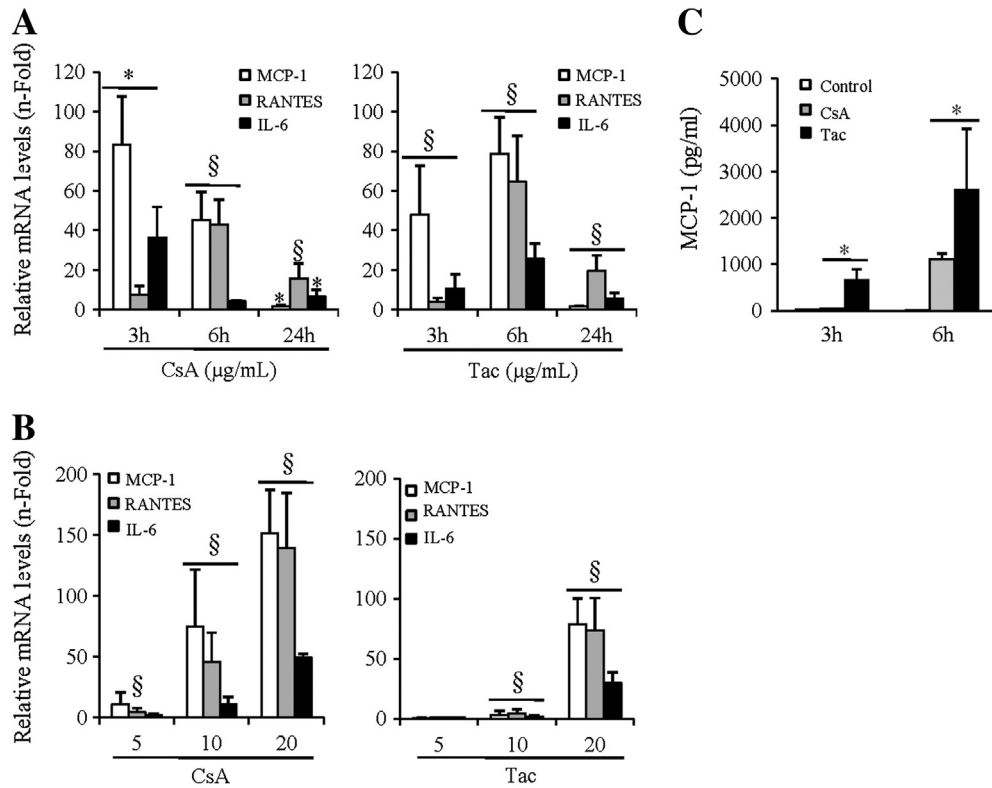


Fig. 1. Calcineurin inhibitors induce the expression of inflammatory mediators in renal tubular cells. Murine renal tubular cells (MCT) were subjected to CsA or tacrolimus (Tac) treatment and the expression of proinflammatory cytokines was evaluated. A) Time-dependent MCP-1, Rantes and IL-6 mRNA expression in cells treated with 10 µg/ml CsA (left panel) or 20 µg/ml Tac (right panel), measured by qRT-PCR. B) Dose-dependent MCP-1, Rantes and IL-6 mRNA expression in cells treated for 6 h with 5–20 µg/ml CsA (left panel) or Tac (right panel). C) MCP-1 protein levels assessed by ELISA in supernatant from cells treated with 10 µg/ml CsA or 20 µg/ml Tac or vehicle. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. **p* ≤ 0.05 and §*p* ≤ 0.02 vs Control.

6 h (Table 1). This response encompassed the increased expression of the NF-κB subunits, Relb, Nfkb1/p50 and Nfkb2/p52 as well as of the IκB family of NF-κB inhibitors, Nfkbia and Nfkbie, and the NF-κB regulators Bcl3, Rhebl1, and Tnfaip3. Moreover, the activity of NF-κB was revealed by the increased expression of a series of NF-κB target genes including cytokines, growth factors, adhesion proteins, TNFR superfamily members, and transcription factors. These included the chemokines Ccl2 (MCP-1), Ccl20, Ccl5 (Rantes), which exhibited the higher increases, and also Cxcl10, Ccl7 and Cxcl11 as well as innate immunity targets, such as Vcam1 and Icam1, and receptors or receptor-associated proteins, namely Ilm and Traf1. The NF-κB transcriptional activity is fine tuned by cooperation with partner transcription factors. The NF-κB/activator protein-1 (AP-1) complex regulates inflammatory gene transcription. Some members of AP-1 subfamilies, namely Atf3, Maff, Fos1, Junb, Mafk, and Fos, were also found differentially upregulated. CNIs also induced the expression of NF-κB-independent cytokines and inflammatory factors including Csf1, Il15ra, Il17ra and Ptgs2, among others.

Calcineurin inhibitors elicit a rapid inflammatory response in cultured murine renal tubular cells

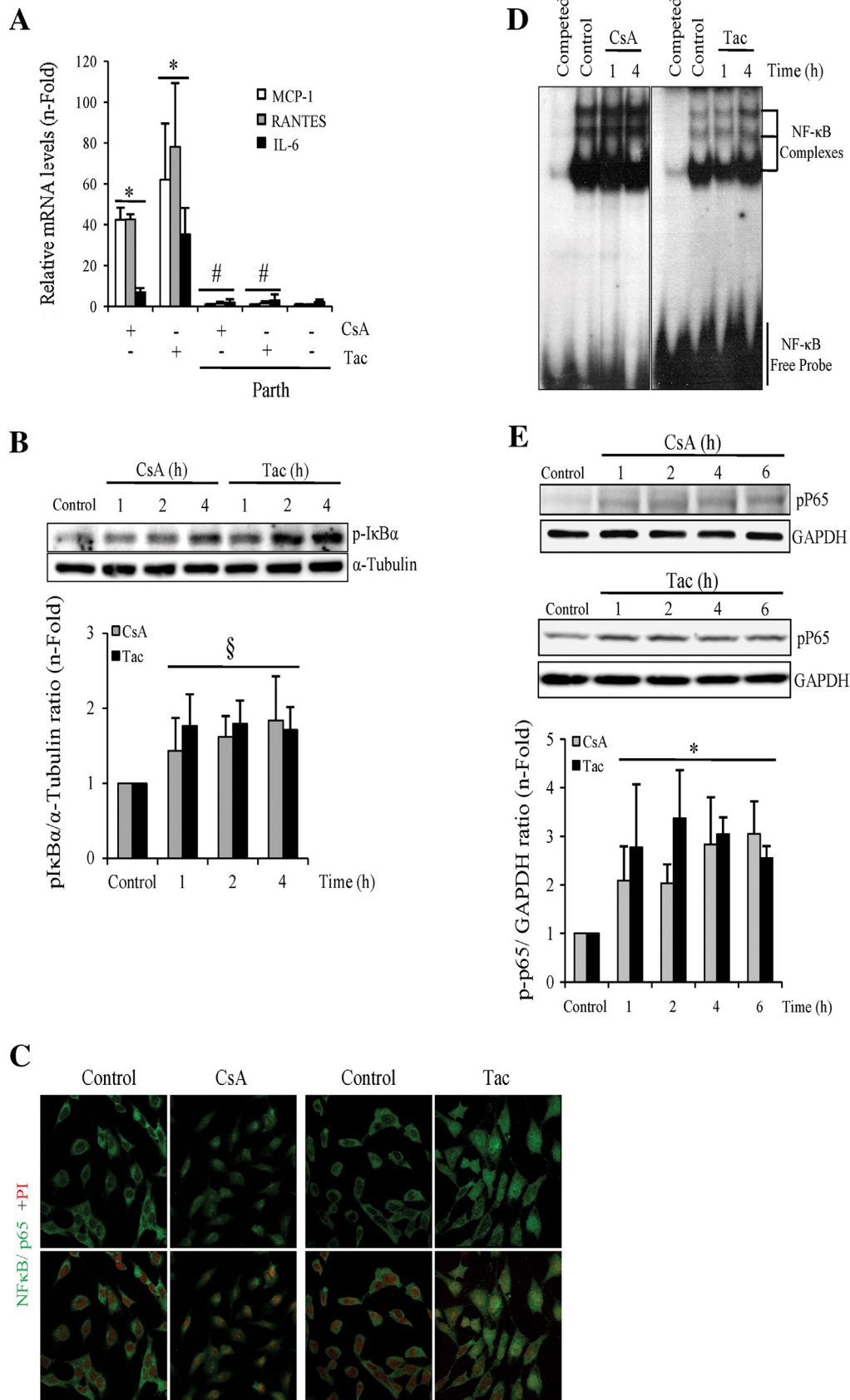
The molecular mechanisms and time-course of CNIs-induced renal inflammation are incompletely characterized. Classic chemokines MCP-1 and Rantes are key initial triggers of tubulointerstitial inflammation by

recruiting monocytes and lymphocytes to injury sites. Moreover, both chemokines are bona fide gene targets of the canonical NF-κB pathway (Saccani et al., 2001). In murine MCT cells, CsA and tacrolimus evoked a time- and dose-dependent expression of MCP-1 and Rantes mRNA as well as of the proinflammatory cytokine IL-6, which is also under the transcriptional control of NF-κB (Figs. 1A and B). According to the known NF-κB-dependent kinetic of induction (Sanz et al., 2010), both chemokines and IL-6 peaked early (3–6 h for both stimuli) and returned to values near control at 24 h, except for Rantes which remained overexpressed at this time (about 20 times over control values).

At 6 h, the magnitude of the overall cellular response was related to the CNIs dosage, 20 µg/ml for both CsA and tacrolimus eliciting more pronounced effects than 5–10 µg/ml. Moreover, the CNI-induced cytokine mRNA synthesis was also corroborated at the protein level as was exemplified by the increased MCP-1 concentration in culture supernatant (Fig. 1C). Taking these and previous (Berzal et al., 2012) results into consideration, we chose 10 µg/ml CsA and 20 µg/ml tacrolimus and, except where otherwise indicated, at time of 6 h as the working conditions to study mechanisms leading to this inflammatory response in tubular cells.

As a conclusion, together with the transcriptomic assays, these results indicated that in murine tubular cells CNIs induce a rapid inflammatory response. We next investigated molecular regulation of this effect.

Fig. 2. Calcineurin inhibitors induce rapid activation of the NF-κB pathway in renal tubular cells. MCT cells were treated with 10 µg/ml CsA or 20 µg/ml Tac. A) Treatment of cells with the NF-κB inhibitor parthenolide (Parth), added at 10 µM 1 h before stimuli, abolished the MCP-1, Rantes and IL-6 mRNA synthesis by CsA or Tac measured following 6 h treatment. Mean ± SD of three independent experiments. **p* ≤ 0.05 vs Control; §*p* ≤ 0.05 vs CsA or Tac. B) CsA and Tac induce IκBα phosphorylation/activation. Representative Western blot (upper) and bar graph (lower) showing the mean ± SD of five independent experiments. §*p* ≤ 0.02 vs Control. C) Representative confocal microscopy immunofluorescence images showing NF-κB/p65 (green) nuclear translocation induced by CsA and Tac in cells stimulated for 1 h. Nuclei were counterstained with PI (red). Original magnification × 400. D) CsA and Tac promote NF-κB DNA binding activity. Representative EMSA of nuclear extracts from MCT cells. E) CsA and Tac induce activating phosphorylation of p65. p65 phosphorylation in the Ser536 analyzed by Western blot. The figure shows a representative Western blot out of three individual experiments for each of the stimuli and their corresponding quantification representing mean ± SD of the total dataset. **p* ≤ 0.05 vs Control. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



The inflammatory response by CNIs depends on NF- κ B engagement and also activates AP-1 and STAT3

NF- κ B regulates the transcription of MCP-1, Rantes and IL-6 genes in tubular cells in response to cytokines (Sanz et al., 2008). Pretreatment of cells with the inhibitor of I κ -B α degradation parthenolide prevented the CNIs-elicited inflammatory response, suggesting regulation by NF- κ B (Fig. 2A). NF- κ B activity is highly regulated at different levels. MCT cells showed increased levels of phosphorylated/activated I κ B α when stimulated with CsA or tacrolimus (average increases of approximately more than one and half times between 1 and 6 h compared to an unstimulated control, respectively) (Fig. 2B), followed by the nuclear translocation of NF- κ B RelA/p65 subunit (Fig. 2C). In addition, CsA and tacrolimus increased NF- κ B DNA binding activity (Fig. 2D). Once bound to DNA, NF- κ B needs several steps for a complete activation of gene expression. Thus, phosphorylation of RelA/p65 on Ser536 stabilizes NF- κ B RelA/p65 binding to DNA and allows the transcription of a subset of inflammatory genes. CsA and tacrolimus induced a sustained RelA/p65 phosphorylation on Ser536 over time, which reached maximum values of approximately more than two times over control in all treatments (Fig. 2E). Moreover, activated NF- κ B interacts and cooperates with other transcription factors such as AP-1 and STAT3 to modulate gene expression (Chaturvedi et al., 2011; Granelli-Piperno et al., 1990). CsA and tacrolimus promoted activation of both transcription factors as judged by the increased AP-1 binding to DNA (Fig. 3A) and by STAT3 phosphorylation (more than one and half times mean increases compared to control for both stimuli) (Fig. 3B) and nuclear translocation (Fig. 3C).

Protein kinases mediate NF- κ B activation and inflammation in response to CNIs

Several signaling pathways may converge to activate NF- κ B. We had previously observed that CsA activates the JAK2/STAT3 pathway to

promote cytotoxicity in tubular cells (Neria et al., 2009) and that JAK2/STAT3 mediated the tubular cell inflammatory response to cytokines (Ucero et al., 2013). The MAP3K TGF β -1-activated kinase-1 (TAK1) and JNK are two related kinases that also mediate inflammation (de Borst et al., 2009; Ma et al., 2011). CsA and tacrolimus recruited JAK2, TAK1 and JNK as evidenced by their increased phosphorylation (Fig. 4A). The JAK2 activation was observed as quickly as 5 min for both CNIs, whereas the activation of JNK and TAK1 was noted from 1 h onward. The magnitude of these responses was almost indistinguishable for CsA and tacrolimus. Moreover, chemical inhibition of JAK2 with AG490 and of TAK1 with (5Z)-7-Oxozeanol prevented CNIs induction of chemokine mRNA while JNK inhibition with SP600125 significantly reduced it (Fig. 4B). Similar behavior was observed for MCP-1 protein expression when evaluated in the presence of the same inhibitors (Fig. 4C). Kinase inhibitors decreased nuclear p65 (Fig. 4D) and DNA binding (Fig. 4E), in cells treated with CsA. These results confirmed the participation of JAK2, JNK and TAK1 as mediators of the inflammatory reaction elicited by CsA and tacrolimus in tubular cells.

CsA and tacrolimus activate the innate immunity receptor TLR4

TLRs are innate immunity sensors that play a key role in the initiation of inflammation. TAK-1 plays an essential and non-redundant role in the activation of both NF- κ B and MAPK pathways by transmitting signals originated in activated TLRs (Loiarro et al., 2010). Since TAK-1 mediates the inflammatory reaction elicited by CNIs in tubular cells (Figs. 4B and C), we explored whether CNIs could signal through TLR by using inhibitors of the adaptor protein Myeloid differentiation factor 88 (Myd88). Myd88 links most TLRs to intracellular partners to transduce external signals into biological responses. The Pepinh-Myd88 competitor peptide, which contains a sequence corresponding to the TIR homodimerization domain of Myd88, and the pharmacological inhibition of two Myd88-complexed members of the interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) significantly attenuated, at approximately to the same extent,

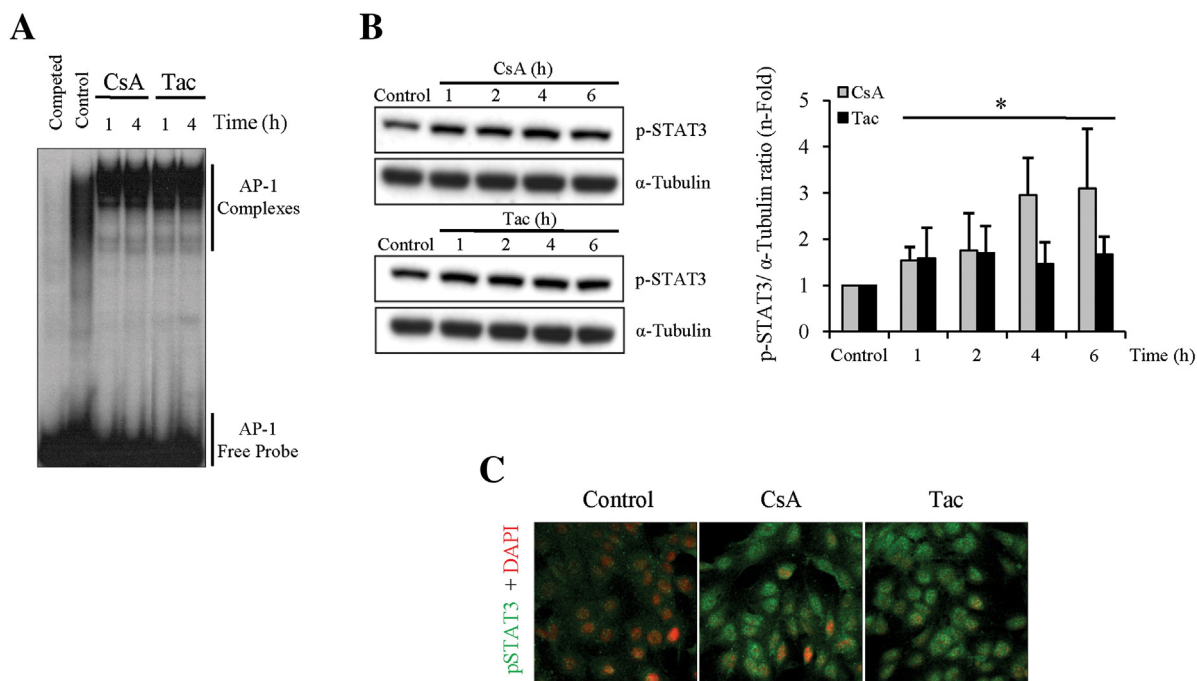


Fig. 3. Calcineurin inhibitors activate AP-1 and STAT3 transcription factors in renal tubular cells. MCT cells were treated with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml Tac. A) The AP-1 DNA binding activity was evidenced by EMSA from nuclear extracts of MCT cells treated with CsA and Tac. Activation of STAT3 was evaluated as phosphorylated STAT3 (B) and nuclear translocation (C). In B, a representative Western blot image (left panel) and the corresponding quantification of five independent experiments (right panel) are shown. * $p \leq 0.05$ vs Control. In C, pSTAT3 (green) nuclear translocation was detected by immunofluorescence microscopy. Nuclei were stained with DAPI (red). Representative confocal images. Original magnification $\times 400$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

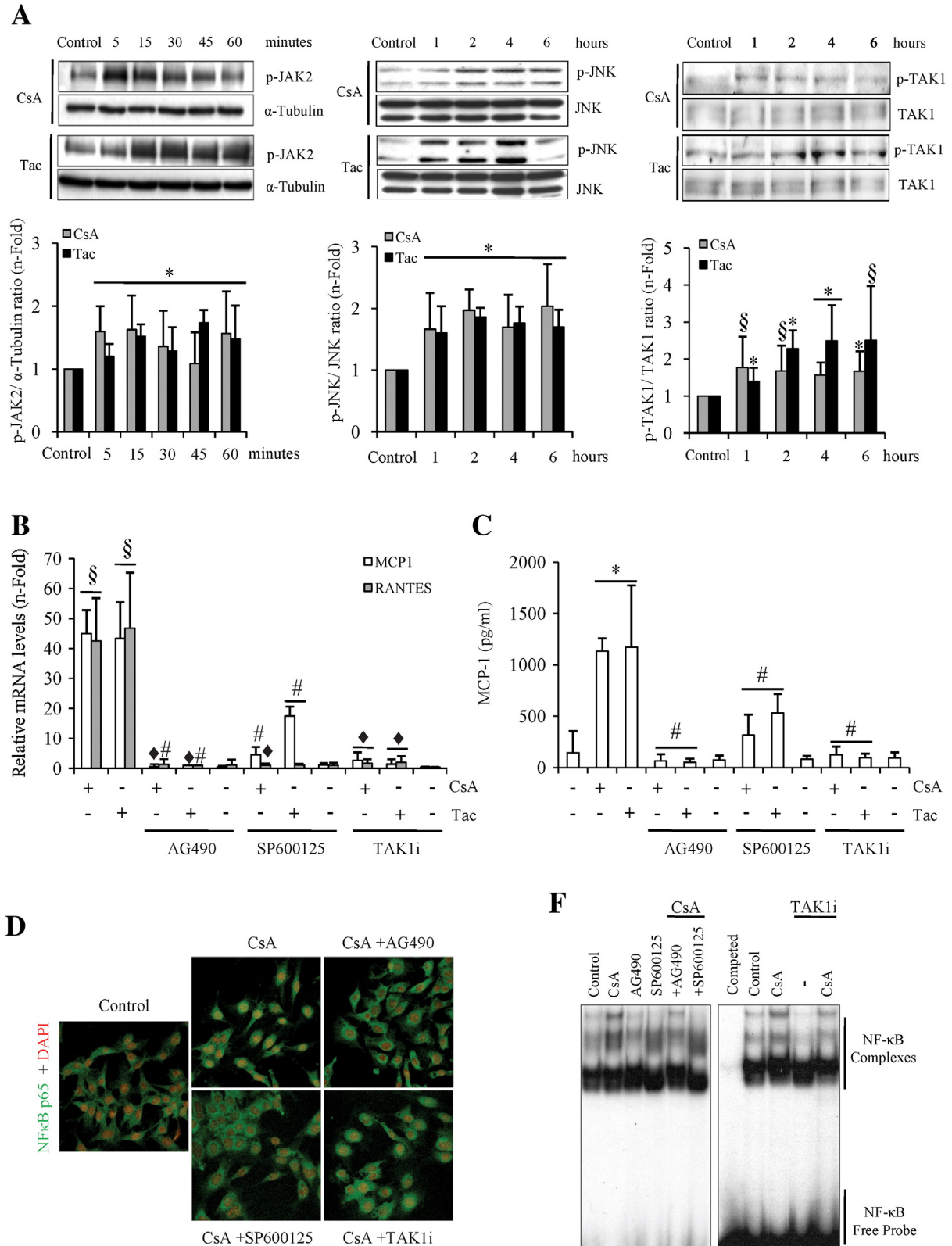


Fig. 4. Activation of JAK2, JNK and TAK1 mediate proinflammatory effects in renal tubular cells stimulated with calcineurin inhibitors. MCT cells were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CsA or 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tac throughout all the experiments. A) CsA and Tac promote JAK2, JNK and TAK1 phosphorylation/activation. MCT cells were treated for the indicated times and then total protein extracts analyzed by Western blot. The figure shows representative Western blots for each protein analyzed (upper panels) with their corresponding quantification (lower panels). Mean \pm SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ and $^{\S}p \leq 0.02$ vs Control. B) Treatment of MCT cells with the protein kinase inhibitors AG490, SP600125 and (5Z)-7-Oxozeaenol (TAK1i) for 60 min and further stimulation with CsA or Tac for 6 h inhibit MCP-1 and Rantes mRNA synthesis. * $p \leq 0.05$ and $^{\S}p \leq 0.02$ vs Control; $^{\#}p \leq 0.05$ vs or $^{\bullet}p \leq 0.02$ vs stimuli alone ($n = 3$). C) Supernatants of cells treated as in B were assayed to quantify MCP-1 protein levels by ELISA. Data are mean \pm SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs Control and $^{\#}p \leq 0.05$ vs stimuli alone. D–E) Representative images of the effect of JAK2, JNK and TAK1 inhibition on CNIs-induced p65 nuclear translocation assessed by confocal microscopy immunofluorescence (D) and by the DNA binding activity assessed by EMSA (E). In D, p65 is shown in green, and nuclei stained with DAPI in red. Original magnification $\times 400$.

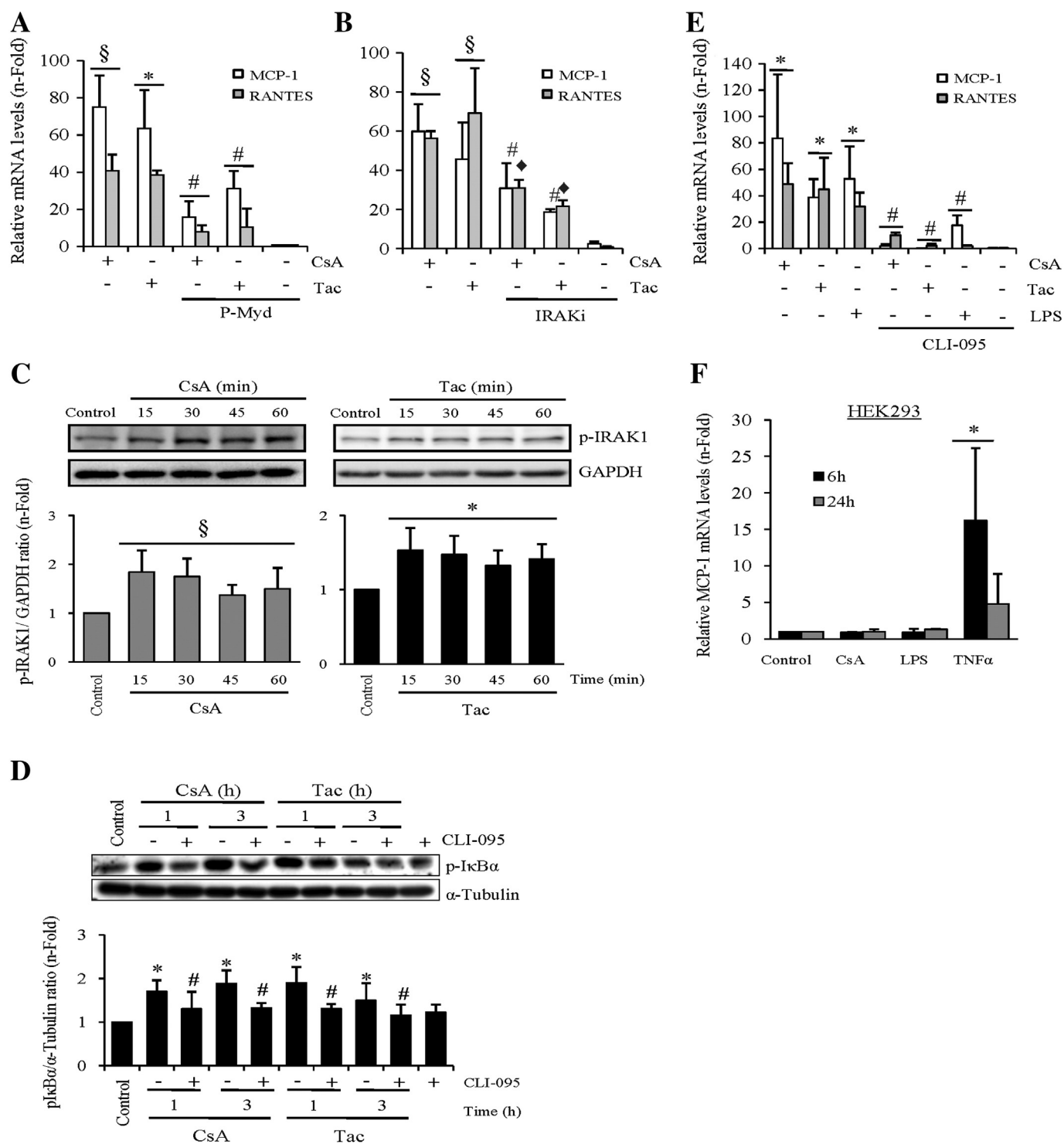


Fig. 5. TLR signaling mediates proinflammatory effects of calcineurin inhibitors in renal tubular cells. A–B) MCT cells were pre-treated for 6 h with the Pepinh-Myd88 (P-Myd) inhibitory peptide to block Myd88 signaling (A) or for 1 h with the IRAK1/4 inhibitor (IRAKi) (B) and then stimulated for additional 6 h with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml Tac. In A, control cells were pre-treated with a Pepinh-control peptide with no recognized inhibitory activity on TLR4. MCP-1 and Rantes mRNA expression was assessed by qRT-PCR. Data are the mean \pm SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ and § $p \leq 0.02$ vs Control; * $p \leq 0.05$ and # $p \leq 0.02$ vs stimuli alone. C) Representative Western blots of phosphorylated IRAK1 (p-IRAK1) levels in MCT cells treated with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml Tac. Data are the mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p \leq 0.05$ and § $p \leq 0.02$ vs Control. D) Inhibition of TLR4 signaling with CLI-095 inhibits I κ B α phosphorylation/activation. MCT cells pre-treated with the TLR4 inhibitor CLI-095 for 6 h and further incubated with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml Tac for the following 3 h. Data are the mean \pm SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs Control and # $p \leq 0.05$ vs CsA or Tac E) Proinflammatory cytokine expression assessed by qRT-PCR in MCT cells that were treated with CLI-095 as in D, next with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml Tac for 3 h. LPS was used as positive control of TLR4 signaling to assess the specificity and efficacy of CLI-095. Data are mean \pm SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs Control; # $p \leq 0.05$ vs stimuli alone. F) Proinflammatory cytokine expression profiles measured by qRT-PCR in human HEK293 cells stimulated with 10 μ g/ml CsA. LPS (1 μ g/ml) was used as control for absence of response and TNF α (30 ng/ml) as positive control of response. Data are the mean \pm SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs Control.

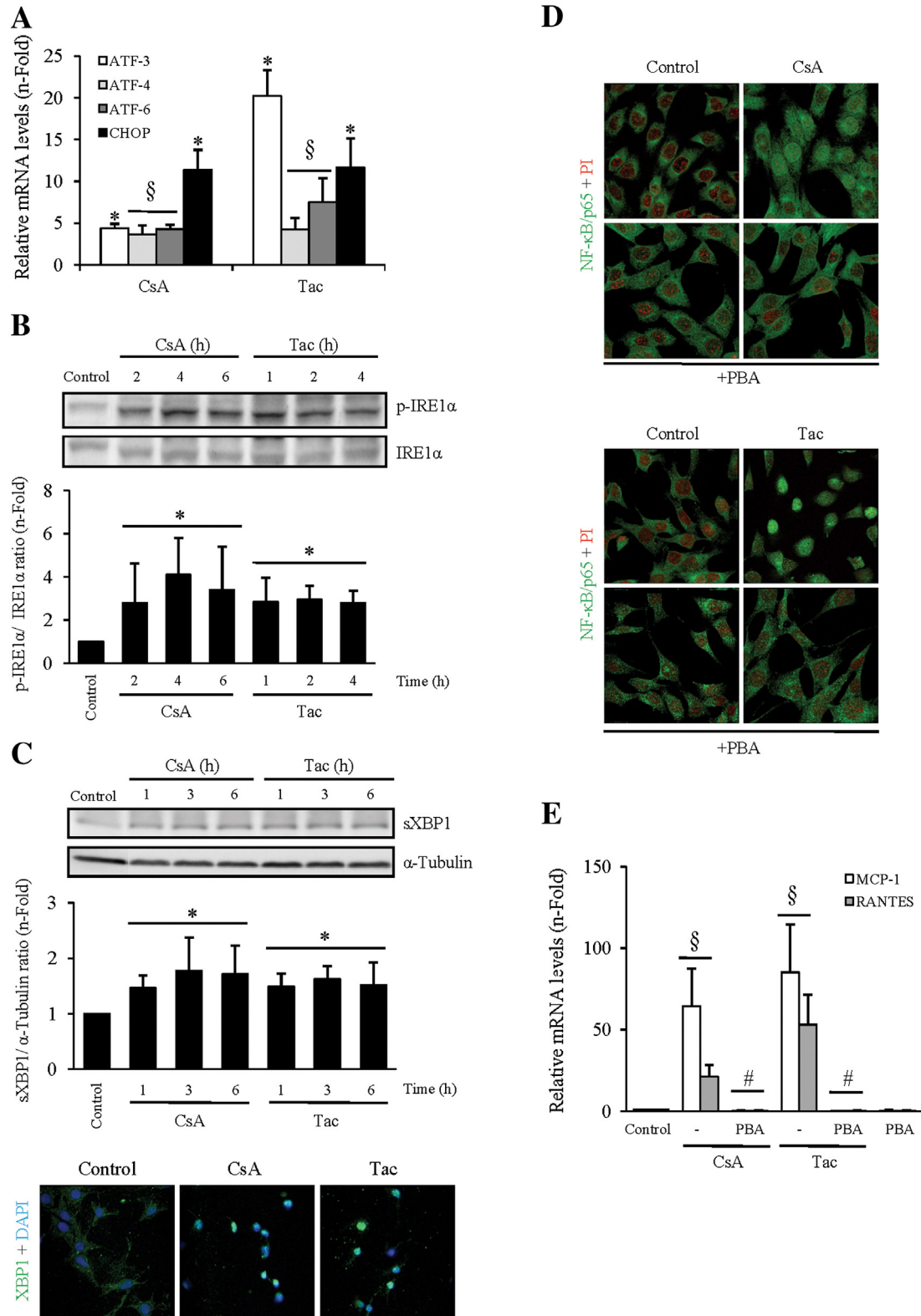


Fig. 6. Calcineurin inhibitors activate the overall UPR. A) qRT-PCR analysis of ATF3, ATF4, ATF6 and CHOP mRNA expression in MCT cells that were treated with 10 μ M CsA or 20 μ M Tac for 6 h. Data are the mean \pm SD of a minimum of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ and § $p \leq 0.02$ vs Control. B) Representative Western blot of phosphorylated IRE1 α (p-IRE1 α) and total IRE1 α (IRE1 α) expression levels in total protein extracts of MCT cells that were treated with 10 μ M CsA or 20 μ M Tac or vehicle (upper panel). Data are mean \pm SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs Control (lower panel). C) Representative Western blot of spliced XBP1 (sXBP1) levels in total protein extracts (upper panel) and representative confocal microscopy experiment showing the nuclear translocation of sXBP1 (green) (lower panel) in MCT cells that were treated with 10 μ M CsA or 20 μ M Tac for 1 to 6 h and for 30 min., respectively. Nuclei were stained with DAPI. Bar graph represents the mean \pm SD of a minimum of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs Control. D) Nuclear translocation of p65 (green) was assessed by confocal microscopy in MCT cells treated with 10 μ M CsA or 20 μ M Tac for 1 h in the absence or in the presence of PBA (10 mM) added 1 h before the stimuli. Nuclei were stained with PI. E) qRT-PCR analysis of MCP-1 and Rantes mRNA expression in MCT cells treated with PBA (10 mM) for 1 h and then with 10 μ M CsA or 20 μ M Tac for 6 h. Data are mean \pm SD ($n = 6$). § $p \leq 0.02$ vs Control; # $p \leq 0.05$ vs stimuli alone. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

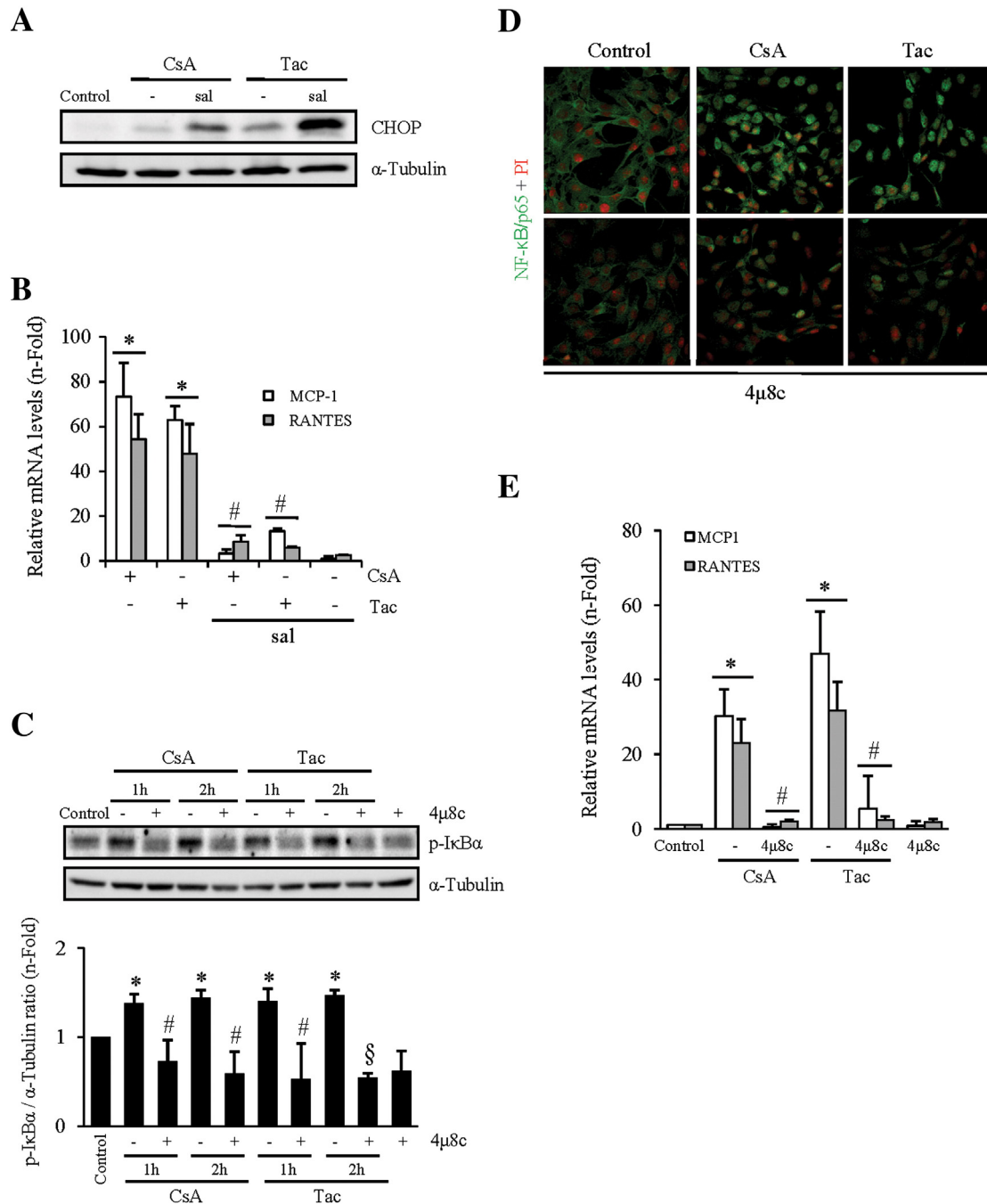


Fig. 7. Activation of the PERK branch of the UPR prevents inflammation while engagement of the IRE1/XBP1 pathway by calcineurin inhibitors generates inflammation through NF-κB activation. A) Salubrinal (sal) potentiates the synthesis of CHOP induced by CsA and Tac. MCT cells were pretreated with sal for 1 h and then with 10 μg/ml CsA or 20 μg/ml Tac for the following 6 h. Representative Western blot. B) Sal prevents inflammation by CNIs. Cells were treated with 10 μg/ml CsA or 20 μg/ml Tac for 6 h. Next to stimuli incubation, MCP-1 and Rantes gene expression was measured by qRT-PCR. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. *p ≤ 0.05 vs Control; #p ≤ 0.05 vs stimuli alone. C–E) Pharmacological inhibition of the IRE1/XBP1 pathway with the IRE1α inhibitor 4μ8c makes MCT cells resistant to the CNIs-induced inflammation. Cells were incubated with 4μ8c (100 μM) for 1 h and then stimulated with 10 μg/ml CsA or 20 μg/ml Tac. C) Evaluation of IκBα phosphorylation by Western blot. Representative experiment. Data are the mean ± SD of three independent experiments. *p ≤ 0.05 vs Control; #p ≤ 0.05 vs CsA or Tac, and §p ≤ 0.02 vs Tac. D) p65 (green fluorescence) nuclear translocation assessed by confocal microscopy. Nuclei were stained with PI. Cells were treated with 4μ8c as in D and then followed by 10 μg/ml CsA or 20 μg/ml Tac addition for 1 h. Representative experiment. E) Transcriptional levels of MCP-1 and Rantes measured by qRT-PCR after 1 h treatment with 4μ8c, then followed by 10 μg/ml CsA or 20 μg/ml Tac for 6 h. Mean ± SD of five experiments. *p ≤ 0.05 vs Control; #p ≤ 0.05 vs stimuli alone.

the chemokine mRNA synthesis elicited by the CNIs (Figs. 5A and B). Consistent with this result, CsA and tacrolimus quickly phosphorylated IRAK1 from 15 min onwards, a step required for TLRs signaling (Fig. 5C).

TLR4 is widely recognized as a mediator of tubular damage and inflammation (Gonçalves et al., 2011). CsA nephrotoxicity correlated with increased kidney TLR4 expression, although a causal relation was not explored (Lim et al., 2005, 2009). Specific suppression of TLR4

signaling was achieved by blocking its intracellular domain with the inhibitor CLI-095. This inhibitor abolished CNIs-induced NF-κB activating events and NF-κB-dependent inflammatory responses triggered by CNIs. Both the IκBα phosphorylation at 1 and 3 h (Fig. 5D) and the NF-κB-dependent mRNA chemokine synthesis at 3 h were hindered, remaining otherwise similar to control values for MCP-1 and hardly higher for Rantes (Fig. 5E). To further explore a possible role of TLR4

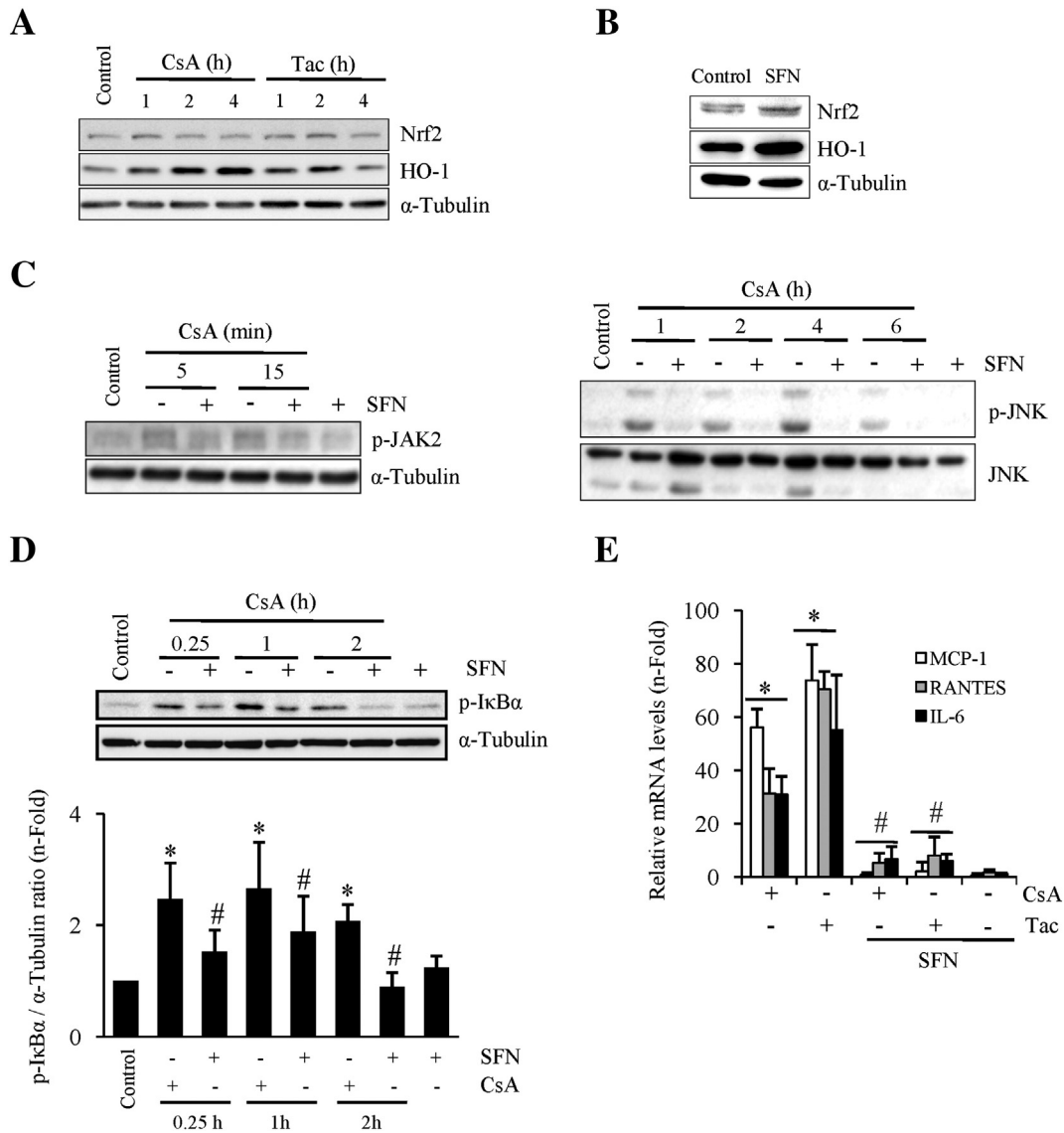


Fig. 8. Activation of the Nrf2/HO-1 pathway prevents inflammation by calcineurin inhibitors. MCT cells and 10 $\mu\text{g/ml}$ CsA or 20 $\mu\text{g/ml}$ Tac were used through all the experiments. When cells were treated with sulforaphane (SFN) (20 μM), this was preincubated for 1 h before stimuli addition. A–B) Representative Western blots of Nrf2 and HO-1 protein levels in cell lysates stimulated with CsA or Tac for 1 to 6 h (A) and SFN for 6 h (B). C) Treatment with SFN downmodulates CNIs-dependent activation of JAK2 and JNK. Representative Western blots for both proteins in total cell lysates treated with CsA and Tac alone or in the presence of SFN. D–E) SFN inhibits activation of the NF- κB pathway by CNIs. Levels of phosphorylated I $\kappa\text{B}\alpha$ assessed by Western blot (* $p \leq 0.05$ vs Control, # $p \leq 0.05$ vs CsA, $n = 3$) (D) and MCP-1, Rantes and IL-6 mRNA expression after 6 h treatment by qRT-PCR. (* $p \leq 0.05$ vs Control; # $p \leq 0.05$ vs stimuli alone, $n = 3$) (E).

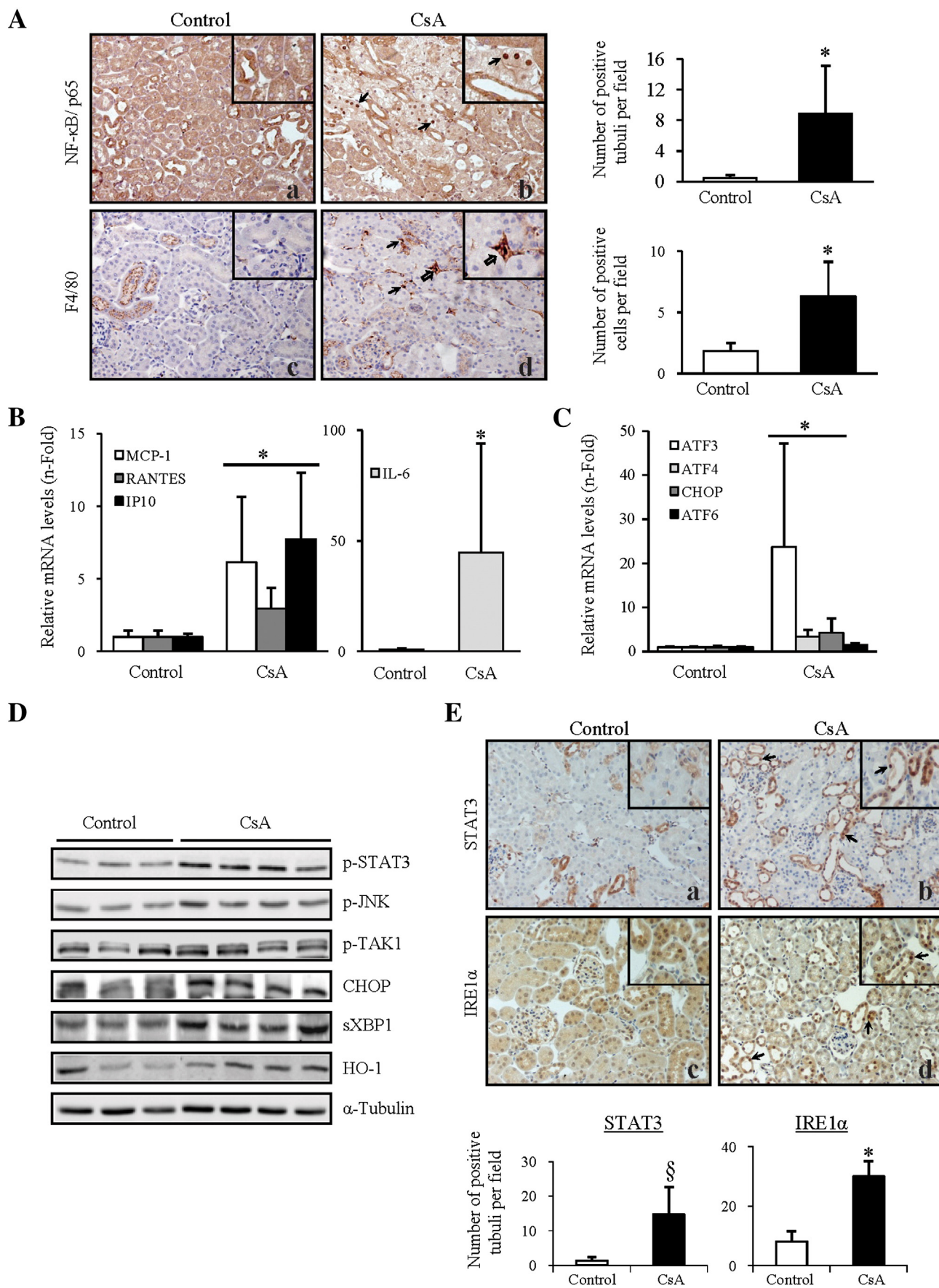
in CNIs-mediated inflammation, we took advantage of the human embryonic tubular cell line HEK293, which does not express TLR4. TNF α signals through its own receptors and elicited an inflammatory response in HEK293 showing typical MCP-1 mRNA synthesis kinetics (approximately 15 and 6 times after 6 and 24 h respectively), while as expected, the TLR4 specific ligand LPS, did not. On the other hand, CsA did not induce inflammatory response in this cell line (Fig. 5F). This fact supports the concept that both CNIs may signal through TLR4.

In addition to TLRs, the IL-1R and other members of the TLR/IL-1R superfamily also exhibit a cytoplasmic TIR domain that provides a docking platform for Myd88 and IRAK1/4 recruitment/activation (Loiario et al., 2010). Given that IL-1 β is critically involved in renal inflammation after processing by the proinflammatory caspase-1 and that caspase-1 may be activated by CNIs (Yang et al., 2001), we studied whether CNIs could induce inflammation through engagement of this signaling pathway. However, pretreatment with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk did not prevent the inflammatory response induced by 10 $\mu\text{g/ml}$ CsA or 20 $\mu\text{g/ml}$ tacrolimus in MCT cells treated for 6 h

(Fig. S1A). Moreover, IL-1 β mRNA transcription was undetectable in resting and CsA-treated MCT cells (data not shown). Finally, blocking IL-1R activity with the IL-1Rn receptor antagonist did not modify the CNIs-induced inflammatory response in cells treated in the same stimuli and time conditions (Fig. S1B).

Calcineurin inhibitors engage the Unfolded Protein Response as part of the general inflammatory response associated with NF- κB signaling

The UPR may either protect from or induce inflammation (Garg et al., 2012). The UPR recruits PERK, ATF6 and IRE1 sensors in response to ER stress (Ron and Walter, 2007). Several components of the UPR were found upregulated in the gene expression array of tubular cells treated with CNIs (Table 1). Genes downstream of PERK (GADD34, CHOP, ATF4, ATF3) and ATF6 were differentially expressed. In contrast, genes belonging to the IRE1/XBP1 pathway were unchanged. Additional genes regulated by the UPR (TRIB3, Dnajb9) and by the UPR-dependent ER-associated protein degradation (ERAD) response (Herpud1) were also upregulated.



Transcriptomics results were confirmed by qRT-PCR in cells treated with the same doses of CNIs and the same time conditions (Fig. 6A). Although initially the IRE1/XBP1 pathway was not transcriptionally regulated, there was evidence of its activation, such as the increased IRE1 α phosphorylation levels that at least doubled the control values (Fig. 6B) and processing of its target protein XBP1, recognized by the appearance and nuclear translocation of the spliced fragment (XBP1s) (Fig. 6C). These results highlighted that CNIs recruit a wide spectrum of proteins belonging to the adaptive UPR and related processes.

Next, we explored the role of UPR in CNIs-triggered inflammation. PBA, an inhibitor of the UPR, prevented CNIs-induced inflammatory responses including the early (1 h) p65 nuclear translocation (Fig. 6D) and the late (6 h) MCP1 and Rantes mRNA synthesis (Fig. 6E).

It was previously reported that activation of the PERK/eIF2 α pathway by CNIs prevents TNF α -mediated proinflammatory responses in tubular cells (Du et al., 2009). However, we found that CsA and tacrolimus induced NF- κ B activation and inflammation despite a concomitant PERK/eIF2 α pathway activation. To characterize the role of this UPR branch under our experimental conditions, we treated tubular cells with the PERK/eIF2 α pathway activator salubrinal. Salubrinal added to cells for 6 h increased CHOP as well as ATF6 mRNA expression to levels comparable to those induced by CNIs (Fig. S2A). Preconditioning of cells with salubrinal also potentiated CNIs-induced CHOP protein expression (Fig. 7A) and prevented the upregulation of NF- κ B-dependent inflammatory genes (Fig. 7B) and NF- κ B/p65 nuclear translocation measured at the same times as in the experiments with PBA (Fig. S2B). In tubular cells salubrinal alone does not promote the expression of inflammatory genes (Fig. 7B). Thus, salubrinal appeared to protect from CNIs-induced inflammation by potentiating the activation of the PERK/eIF2 α pathway, but this effect seems to be insufficient when this route is engaged by the CNIs alone, at least during the first 6 h of treatment. These results suggested that the extension to which PERK/eIF2 α pathway is activated may result in a different outcome of the overall inflammatory process.

IRE1 was previously identified as a promoter of inflammation in tubular cells under metabolic stress (Fougeray et al., 2011). We next investigated the role of the IRE1/XBP1 pathway in the proinflammatory effects of CNIs. To this aim, we used the specific inhibitor of IRE1 α , 4 μ 8C (Cross et al., 2012). Preliminary assays demonstrated that 4 μ 8C downmodulated IRE1/XBP1 pathway activation as judged by the inhibition of IRE1 α phosphorylation and XBP1 nuclear translocation (Fig. S2C). Moreover, 4 μ 8C prevented the time-dependent CNIs-induced I κ B α phosphorylation/activation (Fig. 7C), NF- κ B translocation (Fig. 7D) and expression of MCP-1 and Rantes mRNA (Fig. 7E). Some of these results were reproduced by stimulation with the salicylaldehyde analog 3-Ethoxy-5,6-dibromosalicylaldehyde (3-E-5,6-D, cmpd), another specific inhibitor of IRE1 α (Volkman et al., 2011), further supporting the notion that IRE1 α promoted an inflammatory response to CNIs (Fig. S2D).

Modulation of NF- κ B-mediated inflammation by the Nrf2 pathway in tubular renal cells

The Nrf2 pathway is a master transcriptional regulator of the cellular response to oxidative stress, which also downmodulates proinflammatory

events resulting from innate immunity and UPR activation (Lee et al., 2012; Zong et al., 2012).

The increased heme oxygenase 1 (Hmox1/HO-1) mRNA expression observed in the transcriptomics analysis, suggested that CNIs could engage the Nrf2 pathway (Table 1). Indeed, Nrf2 and HO-1 protein levels were increased in MCT cells treated with both CNIs, thus confirming previously reported data (Shin et al., 2010) (Fig. 8A). To assess the role of the Nrf2 pathway in protecting from CNIs-induced inflammation, we treated tubular cells with the natural Nrf2 activator SFN. This compound increased Nrf2 and HO-1 levels by itself at times relevant to the inflammatory process by the CNIs (1–6 h) (Fig. 8B). Moreover, Nrf2 activation inhibited JAK2 and JNK phosphorylation/activation (Fig. 8C). Finally, SFN inhibited I κ B α phosphorylation/activation (Fig. 8D) and NF- κ B-dependent MCP1, Rantes and IL-6 mRNA synthesis (Fig. 8E). In conclusion, activation of the Nrf2/HO-1 axis may limit CNI-mediated proinflammatory events by interrupting kinase-dependent signaling pathways or by directly inhibiting activating signals upstream of NF- κ B. Activating Nrf2 may be an interesting therapeutic option to limit CNIs-induced inflammation.

CsA induces nephrotoxicity and kidney inflammation in mice in vivo

The *in vivo* effects of CNIs on kidney inflammation were evaluated in a previously described mouse model of acute CsA nephrotoxicity (Neria et al., 2009). Mice that were dosed for 5 days with CsA developed kidney injury characterized by histological architecture changes, the presence of some apoptotic cells and the increased mRNA expression of the tubular injury biomarkers Kim-1 and Ngal (Figs. S3A and B). A mild increase in plasma urea levels was observed (Fig. S3C) and, as expected by the time-course of injury, no kidney fibrosis was found (Fig. S3A).

CsA increased NF- κ B/p65 nuclear translocation in tubular cells (Fig. 9A), the number of infiltrating F4/80 mononuclear cells (Fig. 9A) and the expression of proinflammatory cytokine genes (Fig. 9B). In addition, several molecular regulators and pathways involved in inflammation, which were confirmed as upregulated by CNIs in cultured tubular cells, were also increased in kidney tissue from CsA-treated mice. Evidence of UPR induction included the increased expression of ATF3, ATF4, CHOP and ATF6 mRNA (Fig. 9C), the increased protein levels of sXBP1 (Fig. 9D) and the redistribution of IRE1 α labeling into nuclei (Fig. 9E). Total pSTAT3 (Fig. 9D) and nuclear STAT3 (Fig. 9E) levels were also increased by CsA, suggesting upstream JAK2 activation. There was also evidence of JNK, TLR and cytoprotective (HO-1) signaling activation (Fig. 9D).

NF- κ B and related proinflammatory pathways are associated in CNI nephrotoxicity biopsies

In an attempt to correlate data from cell culture assays and the mouse model with potential inflammatory effects of CNIs in human kidneys, we analyzed biopsies obtained from kidney grafts diagnosed with CNIs toxicity in the absence of acute rejection (Fig. 10). In these samples, prominent nuclear tubular NF- κ B staining suggested activation of the pathway. By contrast, in control kidney tissue, NF- κ B expression was

Fig. 9. Cyclosporine triggers early renal inflammation in mice. Mice received daily vehicle (Control group, $n = 8$) or CsA (CsA group, $n = 8$) and were killed after 5 days. A) Immunohistochemistry showing increased p65 nuclear translocation (a, b) and F4/80 positive cells (c, d) in kidneys from CsA-treated mice. Representative images and the corresponding group quantification. * $p \leq 0.05$ vs Control group. Black arrows indicate tubules with positive nuclear staining for NF- κ B (b) and interstitial mononuclear foci with immunoreactivity against F4/80 (d). White arrow in d points to a group of F4/80 positive cells shown with more detail in the inset (d). Inset image in b shows a cropped region of the area inside the frame with more detail. B) qRT-PCR showed upregulated MCP-1, Rantes, IP-10 and IL-6 mRNA expression in kidneys from mice treated with CsA. Mean \pm SD. * $p \leq 0.05$ vs Control group. C) CsA induces UPR *in vivo*. qRT-PCR showed upregulated ATF3, ATF4, CHOP and ATF6 mRNA expression in kidneys from mice treated with CsA. * $p \leq 0.05$ vs Control group. D–E) *In vivo* expression of early molecular mediators of inflammation upregulated by CsA. D) Western blots of total mouse kidney extracts from representative untreated control and CsA-treated mice. CsA group shows higher levels of phosphorylated STAT3, JNK and TAK1, CHOP, spliced XBP1 (sXBP1) and HO-1. E) Immunohistochemistry of STAT3 and IRE1 α from representative untreated control and CsA-treated mice. Representative images and the corresponding group quantification. * $p \leq 0.05$ and * $p \leq 0.02$ vs Control group. Arrows indicate tubules with nuclear staining of STAT3 and IRE1 α . Inset images show a cropped region of the area inside the frame with more detail to better appreciate nuclear STAT3 (b) and IRE1 α (d) staining in a representative CsA-treated mouse respect to an untreated animal (a, c). Original magnifications $\times 200$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

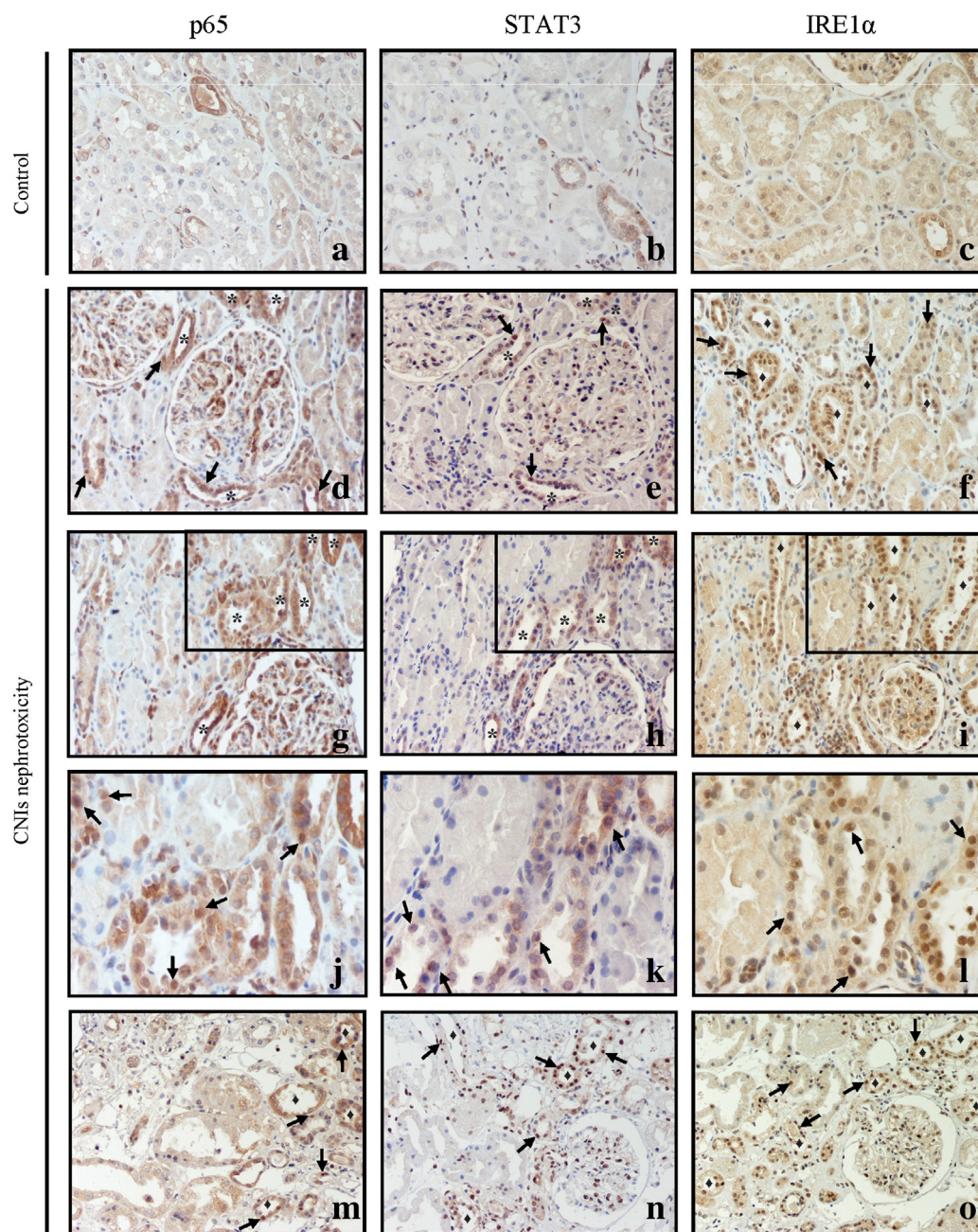


Fig. 10. Activation of inflammatory signaling pathways in human CNIs nephrotoxicity. Increased tubular expression and activation of NF- κ B, STAT3 and IRE1 α are associated to CNIs toxicity in kidney biopsies. Immunohistochemical staining of NF- κ B (a, d, g, j, m), STAT3 (b, e, h, k, n) and IRE1 α (c, f, i, l, o) in renal biopsies from two representative patients (d–l and m–o) diagnosed as having CNIs nephrotoxicity and in control kidney tissue (a–c). Areas inside frames (g, h, i) are depicted with more detail below better discerning staining localization (j, k, i). Asterisks indicate positivity in serial sections of the same renal tubules, diamonds indicate positivity in random tubules along kidney sections and arrows indicate positive nuclei. NF- κ B and STAT3 activation, as denoted by their nuclear translocation is observed in nephrotoxicity tubular cells (d, g, j, m, e, h, k, n) compared with a control sample (a, b). Increased cytoplasmic and nuclear IRE1 α levels is also observed in the nephrotoxicity kidney tissues (f, i, l, o) and were mostly absent in the control sample (c). Original magnifications $\times 200$ (a–i, m–o) and $\times 400$ (j–l).

in general rather weak and with some tubules showing cytoplasmic NF- κ B staining. Strongly increased expression and nuclear translocation of STAT3 and IRE1 α were also observed in the same tubules and areas where NF- κ B was activated. In conclusion, human CNIs nephrotoxicity is associated with tubular NF- κ B activation and activation of other pathways regulating CNIs-induced inflammation in cultured tubular cells.

Discussion

The main finding of this work is that CNIs directly trigger early NF- κ B-dependent inflammatory events in tubular cells by engaging several

previously unrecognized intracellular pathways, thus providing several avenues for both therapeutically targeting nephrotoxicity and preventing CKD progression. Inflammation is an early feature of CNIs nephrotoxicity that predates the characteristic kidney fibrosis.

Despite inflammation being recognized as one of the hallmarks of chronic CNIs nephrotoxicity, triggering mechanisms in CNIs-sensitive tubular epithelia have remained hitherto unexplored. A transcriptomics analysis of tubular cells treated with CsA and tacrolimus disclosed higher expressions of NF- κ B subunits and numerous NF- κ B-inducible and regulatory genes, including large increases of proinflammatory chemokines related to the NF- κ B canonical pathway (Table 1).

Remarkably, the bulk of this response was almost parallel for both CNIs. Tubular cell chemokines are involved in initiating kidney tubulointerstitial inflammation by recruiting immunocompetent cells. Among them, MCP-1 and Rantes have been extensively associated with renal disease induction and antagonism or genetic ablation of these chemokines or their receptors ameliorates kidney damage in mice (Chow et al., 2006, 2007; Kakuta et al., 2012; Kanamori et al., 2007; Pérez de Lema et al., 2005; Xie et al., 2011). In addition, Cxcl1, ccl7 and ccl20 recruit neutrophils and different T-cell subsets to the kidney (Al-Hamidi et al., 2008; Paust et al., 2012; Roche et al., 2007). The NF- κ B-dependent nature of these responses was corroborated by the transcriptional kinetics of early (MCP-1) and late (Rantes) chemokine synthesis (Fig. 1A) and by the inhibitory effect of parthenolide (Fig. 2A). Additional evidence of NF- κ B engagement by CNIs came from the observation of a rapid I κ B α phosphorylation and increased p65 nuclear translocation, DNA binding and phosphorylation (Fig. 2). CNIs also activated the known NF- κ B cooperative transcription factors AP-1 and STAT3 (Fig. 3), as well as the upstream kinases JNK and JAK2 (Fig. 4), all of them known to mediate renal inflammation and injury (de Borst et al., 2009; Neria et al., 2009; Ucerio et al., 2013). JNK and JAK2 can also mediate tubular epithelial mesenchymal transition and death by CNIs (Neria et al., 2009; Pallet et al., 2012), thus providing a link between the different processes that characterize CNIs nephrotoxicity: tubular atrophy, interstitial fibrosis and inflammation. TAK1 is a major upstream activator of JNK and NF- κ B and hence of inflammation in the course of renal injury (Ma et al., 2011). TAK1 is activated by TGF β -dependent and -independent pathways involving TLR stimulation (Sakurai, 2012). CsA stimulated tumor growth by activating the IRAK/TAK1/NF- κ B pathway (Xu et al., 2011). We have now also demonstrated the participation of JNK, JAK2 and TAK1 (Fig. 4) in eliciting inflammatory events in the context of CNIs renal toxicity, a previously non-characterized role. In addition, this finding suggests the possible involvement of the innate immune system in CNIs-induced inflammation.

Innate immunity is typically activated by microbial toxins but also during the course of sterile acute and chronic kidney disease (Gonçalves et al., 2011). CsA may elicit innate immunity responses, including the increased expression of TLR2 and TLR4 in humans as well as in animals chronically treated with the drug. In cultured tubular cells, CsA also induced a delayed expression of TLR4 (Lim et al., 2005, 2009). In the present work, cumulative functional evidence of a rapid TLR engagement by the CNIs came from the downregulation of CNIs-induced cytokine expression by inhibitors of Myd88, IRAK and TLR4 (Fig. 5). These results are in accordance with the proposed pathogenic role of TLR in renal inflammation and injury (Gonçalves et al., 2011), and highlight the potential relevance of TLR signaling in CNIs-induced kidney inflammation. In T cells, calcineurin inhibition by CNIs blocks NF- κ B activation and inflammation (Granelli-Piperno et al., 1990). On the other hand, calcineurin inhibition by CNIs activates NF- κ B in response to TLR-mediated signaling in macrophages (Kang et al., 2007). α -calcineurin KO mice develop chronic nephrotoxicity and associated kidney inflammation (Gooch et al., 2007). The present study suggests that CNIs prevent calcineurin-dependent suppression of TLR signaling as both CNIs, despite being chemically unrelated, engaged the same TLR-associated signaling pathway. In addition, we demonstrated that proinflammatory actions of CNIs also entailed the engagement of additional unrelated molecular pathways.

The three branches of the UPR regulate apoptosis, NF- κ B activation and inflammation (Fougeray et al., 2011; Garg et al., 2012; Kaneko et al., 2003). Whereas IRE1 regulates IKK basal activity, PERK has been found to repress I κ B α translation (Tam et al., 2012). In renal tubular cells, UPR-mediated inflammation has been mainly associated to the IRE1 branch (Fougeray et al., 2011). Results of the present study demonstrated that CNIs engage UPR-related responses (Table 1 and Figs. 6 and 7). In addition, inhibition of not only the overall UPR response (Figs. 6D and E) but also of the specific IRE1/XBP1 branch abrogated NF- κ B-dependent inflammatory responses (Figs. 7C–E and Supplementary

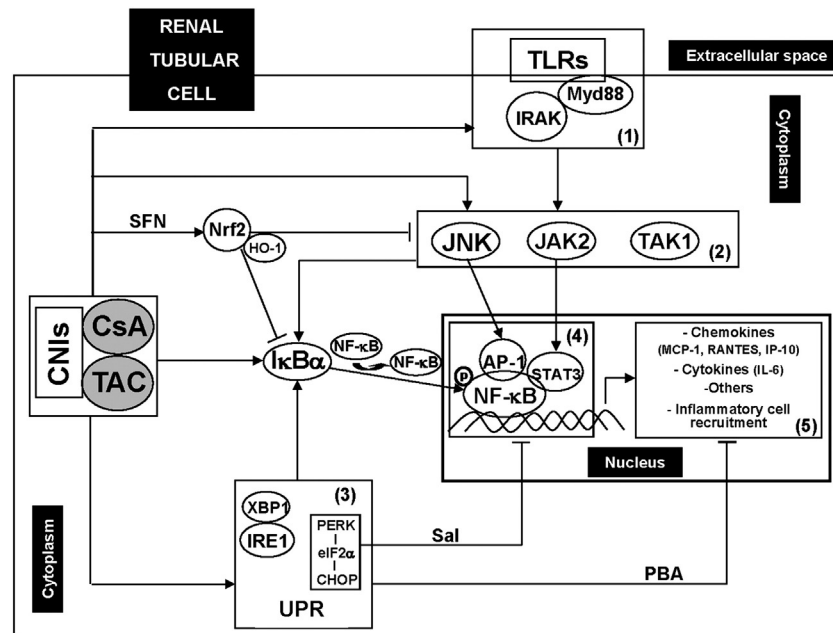


Fig. 11. Overview of intracellular pathways engaged by CNIs that modulate inflammatory responses in renal tubular cells and kidney. In renal tubular cells, CNIs elicit NF- κ B-dependent proinflammatory events (cytokine synthesis and immune cells recruitment) through the engagement of three intracellular signaling cores including engagement of TLR/Myd88/IRAK signaling (1), activation of protein kinases (JAK2, TAK1 and JNK) (2), and activation of the IRE1 branch of the UPR (3). All these intracellular pathways converge at and activate NF- κ B leading to NF- κ B nuclear translocation (4) to increase cytokine and chemokine gene transcription synthesis, protein synthesis and subsequent recruitment of inflammatory cells (5). Concurrent events such as the activation of the transcription factors STAT3 and AP-1 as well as posttranslational phosphorylation steps contribute to more efficient NF- κ B transcriptional activity (4). CNIs also activate protective antiinflammatory responses involving the upregulation of the PERK/eIF2 α /CHOP signaling module of the UPR (3) and the antioxidant Nrf2/HO-1 pathway, which has been related to kidney protection from damaging noxae. Stimulation of the Nrf2 with SFN may directly repress NF- κ B activity or inhibit JAK2 and JNK activation. Repression of the UPR by means of polybutyric acid (PBA) or activation of the PERK branch with salubrinal (sal) prevents CNIs-induced inflammation.

Figs. 2B–D). This observation identifies promotion of inflammation as a previously unrecognized consequence of CNIs-induced UPR. CNIs-induced recruitment of the UPR had been previously involved in tubular vacuolization and cytotoxicity and in renal endothelial EMT promotion (Bouvier et al., 2009; Cheng et al., 2013; Sarró et al., 2012). By contrast, CNIs-induced activation of the PERK/eIF2/CHOP pathway has been reported to downmodulate inflammatory responses in tubular cells in response to TNF α (Du et al., 2009). In accordance with this report, we showed that Salubrinal activation of the PERK pathway was not inflammatory by itself: salubrinal potentiated the CHOP response induced by CNIs (Fig. 7A) whereas it downmodulated CNIs-dependent inflammation (Fig. 7B). However, PERK pathway activation as part of the overall UPR triggered by CNIs (Table 1 and Fig. 6A) was concomitant with NF- κ B activation and inflammation. It is conceivable that increased CHOP synthesis in response to CNIs might serve as compensatory natural response to limit inflammation (Table 1 and Figs. 6A and 7A). Thus, CNIs activation of the UPR may have both proinflammatory and anti-inflammatory consequences, but proinflammatory signals predominate in tubular cells at the time points studied and may contribute to CNI nephrotoxicity.

Further tubular cell adaptive responses against CNIs-induced injury may be the antioxidant Nrf2/HO-1 system. Nrf2/HO-1 induction by CsA may counteract EMT and fibrosis (Shin et al., 2010). Our present results added novel data supporting a role of the Nrf2/HO-1 pathway in limiting CNIs-mediated inflammation in tubular cells. This effect may be ascribed to the inhibition of ROS-dependent activation of pro-inflammatory pathways such as JAK2, JNK and NF- κ B (Fig. 8).

Early identification of CNIs inflammation that may help to prevent progression to chronic nephrotoxicity remains a challenge. In a murine model of early nephrotoxicity by CsA (Fig. 9), we observed modulation of the same proinflammatory signals that we had previously identified as mediating CNIs-dependent inflammation in cultured tubular cells. Thus, kidney tubules from CsA-treated animals exhibited clear signs of inflammatory activity such as NF- κ B nuclear translocation and increased levels of proinflammatory cytokines, along with the presence of mononuclear infiltrates (Figs. 9A and B). As early events promoting NF- κ B activity, we identified evidence of UPR, TLR, JAK2/STAT3 and JNK activation (Figs. 9C–E). In accordance to the cell culture and animal model findings, evidence of NF- κ B, JAK2/STAT3 and IRE1/XBP1 pathways activation was also observed in kidney tissue from patients diagnosed with CNIs nephrotoxicity (Fig. 10). The link between CNIs-induced inflammation and other features of CNIs nephrotoxicity, such as cell death and fibrosis deserves attention. Cell culture experiments using caspase-inhibitors suggest that the inflammatory response is independent from caspase activation and apoptosis (Supplementary Fig. 1). In addition, the absence of fibrosis at the early stage animal model suggests that inflammation precedes and could conceivably contribute to fibrosis (Supplementary Fig. 3).

In this work, we unveiled that several intracellular pathways mediate the NF- κ B activation by the CNIs. Although the relative contribution of each pathway to the NF- κ B activation remains a matter of discussion, we showed that individual targeting of each of them precluded the NF- κ B-dependent inflammatory response. Thus, NF- κ B appears to be placed in a crossroad of several intracellular signaling pathways and hence emerge as an attractive therapeutic target.

We have now shown that intracellular signals leading to inflammation are known contributors to experimental kidney injury and some of them may be targeted by small molecule inhibitors of kinases, cellular receptors and transcription factors (de Borst et al., 2009; Gonçalves et al., 2010, 2011; Ma et al., 2011; Sanz et al., 2008; Ucero et al., 2013).

Moreover, novel therapeutic tools targeting proinflammatory transcription factor-regulated pathways are in the pipeline and include chemicals, monoclonal antibodies and oligonucleotides (Kwak et al., 2011; Page et al., 2011). Molecules targeting some of these proinflammatory pathways, like JAK2/STAT3, JNK and TLR4, are already undergoing clinical trials (ClinicalTrials.gov: NCT00955812, NCT01563302, NCT00696176, NCT01630252, NCT01808469), although

not in the context of kidney injury. However, if their human use proves safe and effective, some of these inhibitors could constitute potential approaches to prevent or treat kidney injury and specifically CNIs-associated kidney inflammation and nephrotoxicity.

In summary, our data show that multiple signaling pathways may regulate the CNIs-induced inflammatory response in renal tubular cells, including activation of both proinflammatory and anti-inflammatory pathways (Fig. 11). However, proinflammatory pathways predominate in tubular cells and may contribute to human CNIs nephrotoxicity. These findings provide novel therapeutic targets to protect from CNIs nephrotoxicity, thus potentially contributing to a safer use of these compounds.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.011>.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

Grant support: ISCIII and FEDER funds FIS PS09/00447, ISCIII-RETIC REDinREN RD12/0021, Comunidad de Madrid/CIFRA/S2010/BMD-2378, PI08/1043, PI11/02242. Salary support: Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz to CGG, COS, SB; RedinRen to SC; UAM to JE; FIS to BFF (Programa Rio Hortega), AO (Programa Intensificación Actividad Investigadora, ISCIII/Agencia Laín-Entralgo/CM) and AMR (Programa Miguel Servet). IIS-Fundacion Jimenez Diaz biobank (RD09/0076/00101) for samples.

Author contributions

Performed the experiments: CG, CO, SB, SC. Analyzed the data: CG, CO, SB, AMR. Selected the patients and biopsies for human studies: BF and PC. Contributed reagents/materials/analysis tools: JE, AO. Wrote the paper: AO, AMR. Conceptual design: AMR. Direction of the experimental work: AMR

References

- Al-Hamidi, A., Pekalski, M., Robertson, H., Ali, S., Kirby, J.A., 2008. Renal allograft rejection: the contribution of chemokines to the adhesion and retention of alphaE(CD103) beta7 integrin-expressing intratubular T cells. *Mol. Immunol.* 45, 4000–4007.
- Berzal, S., Alique, M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A., Ramos, A.M., 2012. GSK3, snail, and adhesion molecule regulation by cyclosporine A in renal tubular cells. *Toxicol. Sci.* 127, 425–437.
- Bouvier, N., Flinois, J.P., Gilleron, J., Sauvage, F.L., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., Anglicheau, D., Pallet, N., 2009. Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296, F160–F169.
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J.M., Pascual-Montano, A., 2007. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 8, R3.
- Chaturvedi, M.M., Sung, B., Yadav, V.R., Kannappan, R., Aggarwal, B.B., 2011. NF- κ B addition and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene* 30, 1615–1630.
- Cheng, C.H., Shu, K.H., Chang, H.R., Chou, M.C., 2013. Cyclosporine-induced tubular vacuolization: the role of Bip/Grp78. *Nephron Exp. Nephrol.* 122, 1–12.
- Chow, F.Y., Nikolic-Paterson, D.J., Ozols, E., Atkins, R.C., Rollin, B.J., Tesch, G.H., 2006. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int.* 69, 73–80.
- Chow, F.Y., Nikolic-Paterson, D.J., Ma, F.Y., Ozols, E., Rollins, B.J., Tesch, G.H., 2007. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia* 50, 471–480.
- Cross, B.C., Bond, P.J., Sadowski, P.G., Jha, B.K., Zak, J., Goodman, J.M., Silverman, R.H., Neubert, T.A., Baxendale, I.R., Ron, D., Harding, H.P., 2012. The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E869–E878.
- Daha, M.R., van Kooten, C., 2000. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol. Dial. Transplant.* 15 (Suppl. 6), 41–43.
- de Borst, M.H., Prakash, J., Sandovici, M., Klok, P.A., Hamming, I., Kok, R.J., Navis, G., van Goor, H., 2009. c-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulointerstitial inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331, 896–905.
- Du, S., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Kasai, A., Okamura, M., Huang, T., Yao, J., Takeda, M., Araki, I., Sawada, N., Paton, A.W., Paton, J.C., Kitamura, M., 2009. Suppression of NF-kappaB by cyclosporin A and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J. Immunol.* 182, 7201–7211.

- Fougeray, S., Bouvier, N., Beaune, P., Legendre, C., Anglicheau, D., Thervet, E., Pallet, N., 2011. Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Differ.* 2, e143.
- Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Agostinis, P., 2012. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? *Trends Mol. Med.* 18, 589–598.
- Gonçalves, S., Fernandez-Sanchez, R., Sanchez-Niño, M.D., Tejedor, A., Neria, F., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., 2010. Typhostins as potential therapeutic agents for acute kidney injury. *Curr. Med. Chem.* 17, 974–986.
- Gonçalves, G.M., Castoldi, A., Braga, T.T., Câmara, N.O., 2011. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand. J. Immunol.* 73, 428–435.
- Gooch, J.L., Roberts, B.R., Cobbs, S.L., Tumlin, J.A., 2007. Loss of the alpha-isoform of calcineurin is sufficient to induce nephrotoxicity and altered expression of transforming growth factor-beta. *Transplantation* 83, 439–447.
- Granelli-Piperno, A., Nolan, P., Inaba, K., Steinman, R.M., 1990. The effect of immunosuppressive agents on the induction of nuclear factors that bind to sites on the interleukin 2 promoter. *J. Exp. Med.* 172, 1869–1872.
- Haverty, T.P., Kelly, C.J., Hines, W.H., Amenta, P.S., Watanabe, M., Harper, R.A., Kefalides, N.A., Neilson, E.G., 1988. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J. Cell Biol.* 107, 1359–1368.
- Hortelano, S., López-Collazo, E., Boscá, L., 1999. Protective effect of cyclosporin A and FK506 from nitric oxide-dependent apoptosis in activated macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1139–1146.
- Hortelano, S., Castilla, M., Torres, A.M., Tejedor, A., Boscá, L., 2000. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2315–2323.
- Justo, P., Lorz, C., Sanz, A., Egido, J., Ortiz, A., 2003. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 3072–3080.
- Kakuta, Y., Okumi, M., Miyagawa, S., Tsutahara, K., Abe, T., Yazawa, K., Matsunami, K., Otsuka, H., Takahara, S., Nonomura, N., 2012. Blocking of CCR5 and CXCR3 suppresses the infiltration of macrophages in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 93, 24–31.
- Kanamori, H., Matsubara, T., Mima, A., Sumi, E., Nagai, K., Takahashi, T., Abe, H., Iehara, N., Fukatsu, A., Okamoto, H., Kita, T., Doi, T., Arai, H., 2007. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 772–777.
- Kaneko, M., Niinuma, Y., Nomura, Y., 2003. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 931–935.
- Kang, Y.J., Kusler, B., Otsuka, M., Hughes, M., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W.C., Akira, S., Han, J., Jones, P.P., 2007. Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways. *J. Immunol.* 179, 4598–4607.
- Kwak, J.H., Jung, J.K., Lee, H., 2011. Nuclear factor-kappa B inhibitors: a patent review (2006–2010). *Expert Opin. Ther. Pat.* 21, 1897–1910.
- Lee, S., Hur, E.G., Ryoo, I.G., Jung, K.A., Kwak, J., Kwak, M.K., 2012. Involvement of the Nrf2-proteasome pathway in the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic β -cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 431–438.
- Lim, S.W., Li, C., Ahn, K.O., Kim, J., Moon, I.S., Ahn, C., Lee, J.R., Yang, C.W., 2005. Cyclosporine-induced renal injury induces toll-like receptor and maturation of dendritic cells. *Transplantation* 80, 691–699.
- Lim, B.J., Hong, S.W., Jeong, H.J., 2009. Renal tubular expression of Toll-like receptor 4 in cyclosporine nephrotoxicity. *APMIS* 117, 583–591.
- Ling, H., Li, X., Jha, S., Wang, W., Karetskaya, L., Pratt, B., Ledbetter, S., 2003. Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 377–388.
- Loiarro, M., Ruggiero, V., Sette, C., 2010. Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases. *Mediators Inflamm.* 2010, 674363.
- Ma, F.Y., Tesch, G.H., Ozols, E., Xie, M., Schneider, M.D., Nikolic-Paterson, D.J., 2011. TGF- β 1-activated kinase-1 regulates inflammation and fibrosis in the obstructed kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 300, F1410–F1421.
- Mizui, M., Isaka, Y., Takabatake, Y., Mizuno, S., Nakamura, T., Ito, T., Imai, E., Hori, M., 2004. Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 65, 2041–2053.
- Naesens, M., Kuypers, D.R., Sarwal, M., 2009. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4, 481–508.
- Neria, F., Castilla, M.A., Sanchez, R.F., Gonzalez Pacheco, F.R., Deudero, J.J., Calabia, O., Tejedor, A., Manzarbeitia, F., Ortiz, A., Caramelo, C., 2009. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int.* 75, 227–234.
- Nishiyama, S., Manabe, N., Kubota, Y., Ohnishi, H., Kitanaka, A., Tokuda, M., Taminato, T., Ishida, T., Takahara, J., Tanaka, T., 2005. Cyclosporin A inhibits the early phase of NF-kappaB/RelA activation induced by CD28 costimulatory signaling to reduce the IL-2 expression in human peripheral T cells. *Int. Immunopharmacol.* 5, 699–710.
- Pabla, N., Dong, Z., 2008. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 73, 994–1007.
- Page, B.D., Ball, D.P., Gunning, P.T., 2011. Signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 21, 65–83.
- Pallet, N., Thervet, E., Anglicheau, D., 2012. c-Jun-N-Terminal kinase signaling is involved in cyclosporine-induced epithelial phenotypic changes. *Am. J. Transplant.* 348604.
- Paust, H.J., Turner, J.E., Riedel, J.H., Disteldorf, E., Peters, A., Schmidt, T., Krebs, C., Velden, J., Mittrücker, H.W., Steinmetz, O.M., Stahl, R.A., Panzer, U., 2012. Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 82, 72–83.
- Pérez de Lema, G., Maier, H., Franz, T.J., Escribese, M., Chilla, S., Segerer, S., Camarasa, N., Schmid, H., Banas, B., Kalaydjiev, S., Busch, D.H., Pfeffer, K., Mampaso, F., Schlöndorff, D., Luckow, B., 2005. Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3592–3601.
- Roche, J.K., Keepers, T.R., Gross, L.K., Seaner, R.M., Obrig, T.G., 2007. CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 are critical effectors and potential targets for therapy of *Escherichia coli* O157: H7-associated renal inflammation. *Am. J. Pathol.* 170, 526–537.
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.
- Saccani, S., Pantano, S., Natoli, G., 2001. Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J. Exp. Med.* 193, 1351–1359.
- Sakurai, H., 2012. Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 522–530.
- Sanz, A.B., Justo, P., Sanchez-Niño, M.D., Blanco-Colio, L.M., Winkles, J.A., Kretzler, M., Jakubowski, A., Blanco, J., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., 2008. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 695–703.
- Sanz, A.B., Sanchez-Niño, M.D., Ramos, A.M., Moreno, J.A., Santamaría, B., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A., 2010. NF-kappaB in renal inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21 (8), 1254–1262.
- Sarró, E., Jacobs-Cachá, C., Itarte, E., Meseguer, A., 2012. A pharmacologically-based array to identify targets of cyclosporine A-induced toxicity in cultured renal proximal tubule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 275–287.
- Shin, D.H., Park, H.M., Jung, K.A., Choi, H.G., Kim, J.A., Kim, D.D., Kim, S.G., Kang, K.W., Ku, S.K., Kensler, T.W., Kwak, M.K., 2010. The Nrf2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1051–1063.
- Tam, A.B., Mercado, E.L., Hoffmann, A., Niwa, M., 2012. ER stress activates NF- κ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PLoS One* 7, e45078.
- Ucero, A.C., Berzal, S., Ocaña-Salceda, C., Sancho, M., Orzáez, M., Meseguer, A., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Vicent, M.J., Ortiz, A., Ramos, A.M., 2013. A polymeric nanomedicine diminishes inflammatory events in renal tubular cells. *PLoS One* 8, e51992.
- Volkman, K., Lucas, J.L., Vuga, D., Wang, X., Brumm, D., Stiles, C., Kriebel, D., Der-Sarkissian, A., Krishnan, K., Schweitzer, C., Liu, Z., Malyankar, U.M., Chiovitti, D., Canny, M., Durocher, D., Sicheri, F., Patterson, J.B., 2011. Potent and selective inhibitors of the inositol-requiring enzyme 1 endoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 286, 12743–12755.
- Xiao, Z., Shan, J., Li, C., Luo, L., Lu, J., Li, S., Long, D., Li, Y., 2013. Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review. *Am. J. Nephrol.* 37, 30–40.
- Xie, C., Liu, K., Fu, Y., Qin, X., Jonnala, G., Wang, T., Wang, H.W., Maldonado, M., Zhou, X.J., Mohan, C., 2011. RANTES deficiency attenuates autoantibody-induced glomerulonephritis. *J. Clin. Immunol.* 31, 128–135.
- Xu, J., Walsh, S.B., Verney, Z.M., Kopelovich, L., Elmets, C.A., Athar, M., 2011. Procarcinogenic effects of cyclosporine A are mediated through the activation of TAK1/TAB1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 363–368.
- Yang, C.W., Ahn, H.J., Han, H.J., Kim, W.Y., Li, C., Shin, M.J., Kim, S.K., Park, J.H., Kim, Y.S., Moon, I.S., Bang, B.K., 2001. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* 72, 1753–1759.
- Zong, Z.H., Du, Z.X., Li, N., Li, C., Zhang, Q., Liu, B.Q., Guan, Y., Wang, H.Q., 2012. Implication of Nrf2 and ATF4 in differential induction of CHOP by proteasome inhibition in thyroid cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1395–1404.

TLR4-mediated inflammation is a key pathogenic event leading to kidney damage and fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity

Cristian González-Guerrero^{1,2} · Pablo Cannata-Ortiz^{2,3} · Consuelo Guerri⁴ ·
Jesús Egido^{1,5} · Alberto Ortiz^{1,2,5} · Adrián M. Ramos^{1,2,6}

Received: 16 June 2016 / Accepted: 24 August 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Cyclosporine A (CsA) successfully prevents allograft rejection, but nephrotoxicity is still a dose-limiting adverse effect. TLR4 activation promotes kidney damage but whether this innate immunity receptor mediates CsA nephrotoxicity is unknown. The *in vivo* role of TLR4 during CsA nephrotoxicity was studied in mice co-treated with CsA and the TLR4 inhibitor TAK242 and also in TLR4^{-/-} mice. CsA-induced renal TLR4 expression in wild-type mice. Pharmacological or genetic targeting of TLR4 reduced the activation of proinflammatory signaling, including JNK/c-jun, JAK2/STAT3, IRE1 α and NF- κ B and the expression of Fn14. Expression of proinflammatory factors and cytokines was also decreased, and kidney monocyte and lymphocyte influx was prevented. TLR4 inhibition

also reduced tubular damage and drastically prevented the development of kidney fibrosis. *In vivo* and *in vitro* CsA promoted secretion of the TLR ligand HMGB1 by tubular cells upstream of TLR4 activation, and prevention of HMGB1 secretion significantly reduced CsA-induced synthesis of MCP-1, suggesting that HMGB1 may be one of the mediators of CsA-induced TLR4 activation. These results suggest that TLR4 is a potential pharmacological target in CsA nephrotoxicity.

Keywords Cyclosporine A · TLR4 · Innate immunity · Nephrotoxicity · Inflammation · Fibrosis

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00204-016-1830-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Adrián M. Ramos
amramos@fjd.es

- ¹ Laboratory of Nephrology and Vascular Pathology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, School of Medicine, Madrid, Spain
- ² REDINREN, Madrid, Spain
- ³ Pathology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, School of Medicine, UAM, Madrid, Spain
- ⁴ Department of Cellular Pathology, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain
- ⁵ Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Madrid, Spain
- ⁶ Laboratorio de Patología Renal y Vascular (Investigación, 4° planta), Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos N°2, CP28040 Madrid, Spain

Introduction

Cyclosporine A (CsA) was the first calcineurin inhibitor (CNI) available in the clinic and is still extensively used throughout the world. In fact, CsA is the only CNI included in the last updated World Health Organization (WHO) list of essential medicines (WHO 2015). CsA was a breakthrough that increased organ and patient survival. Moreover, CsA is routinely used to treat autoimmune disorders (Ponticelli 2005). Unfortunately, chronic CsA therapy increases the risk of chronic nephrotoxicity (Naesens et al. 2009). Although acute renal side effects may be reversible and can be minimized through strategies to reduce drug exposure, this often does not prevent chronic nephrotoxicity, a subtle, non-reversible process leading to progressive organ fibrosis (Sawinski et al. 2016). Molecular mechanisms underlying CsA nephrotoxicity have been extensively researched, although they remain to be completely characterized. Inflammation encompasses adaptive and protective mechanisms set in motion to repair damaged tissues and eliminate invading microorganisms.

However, long lasting activation or an exaggerated inflammatory reaction may become a pathologic, disease-causing response. Uncontrolled inflammation contributes to the genesis and progression of kidney injury (Meng et al. 2014). We thus explored novel inflammatory mechanisms potentially involved in CsA nephrotoxicity, as a model drug for CNi nephrotoxicity. In cultured renal tubular cells, we defined for the first time a toll-like receptor (TLR) activity compatible with toll-like receptor 4 (TLR4) as an important mechanism leading to CsA-induced proinflammatory cytokine synthesis (González-Guerrero et al. 2013). High TLR4 expression has been reported in kidneys from CsA-treated rats and in human renal biopsies from IgA nephropathy patients treated with CsA (Lim et al. 2005, Lim et al. 2009). However, lack of functional studies probing a role of TLR4 in CsA nephrotoxicity *in vivo* precludes definitive conclusions about the meaning of these findings. Thus, it is presently unknown whether TLR4 is engaged in the course of CsA nephrotoxicity, and if so, whether it is an epiphenomenon or a key mediator of CsA-induced inflammation *in vivo* leading to tissue injury.

Innate immunity is the set of non-specific natural responses that initiate and help to mount an adaptive immune response. Toll-like receptors (TLRs) are an important primary innate immunity barrier first described as a defense against invading microorganisms. However, TLRs may have an active role in sterile inflammation (Gluba et al. 2010; Loiarro et al. 2010). Thus, TLRs bind endogenous ligands secreted by damaged or stressed tissues that otherwise remain confined inside non-injured cells. Among these endogenous ligands, the chromatin protein high mobility group box 1 (HMGB1) binds to TLR4 and promotes kidney injury in several models of renal disease (Zhou 2014). In addition, HMGB1 may activate additional TLRs, such as TLR2, and also the receptor for advanced glycation end products (RAGE; Wu et al. 2010). Signaling through TLR4 triggers signaling pathways through the assembly of proximal complexes around the intracellular adaptor molecules Myeloid differentiation factor 88 (Myd88) and TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon- β (TRIF). Important downstream TLR4 targets are the MAPK/JNK/AP-1 pathway and I κ B α kinases, leading to activation of NF- κ B-dependent transcription of pro-inflammatory chemokines (Loiarro et al. 2010). Experimental targeting of TLR4 improves kidney inflammation and also tubulointerstitial damage, fibrosis and renal function in experimental ischemia–reperfusion (Wu et al. 2007; Zhang et al. 2008; Gluba et al. 2010), but its role on CsA nephrotoxicity had not been explored.

In this work, we tested whether the *in vivo* targeting of TLR4 ameliorates CsA-induced kidney inflammation, tubulointerstitial damage and fibrosis and further explored mechanisms of TLR4 activation in this context.

Materials and methods

Animal models

All animal procedures were performed according to the European Community and Animal Research Ethical Committee guidelines. Animal protocols were approved by the IIS-FJD Animal Research Ethical Committee (Comunidad de Madrid, RD 53/2013). Male, 12-week-old wild-type C57/BL/6 (Charles River, Chatillon-sur-Charlaronne, France) or TLR4^{−/−} C57/BL/6 mice (Dr. S Akira, Osaka University, Suita, Japan) received 50 mg/kg/day CsA (Sandimmun®, Novartis, sc) or vehicle (0.9 % saline, sc) for 10 days. A group of mice received 3 mg/kg/day TAK242 (Calbiochem, Merck Chemicals, ip) along with CsA. A control group was only treated with TAK242. Mice ($n = 5–8$ per group) were euthanized under anesthesia with 35 mg/kg ketamine (ketolar/Pfizer) and 5 mg/kg xylazine (Rompun/Bayer) following 10 or 20 days of CsA administration. Blood for urea assessment was drawn from the femoral artery and kidneys were perfused *in situ* with cold saline before removal. One kidney was snap frozen in liquid nitrogen for RNA and protein studies and the other fixed and paraffin embedded.

Gene expression studies

Total RNA was extracted from tissue and cells by Tripure (Roche, Spain), and 1 μ g RNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative PCR was performed by using a 7500 Real-Time PCR System with the Prism 7000 System SDS Software (Applied Biosystems). RNA expression was corrected for glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. Predesigned qPCR probes are listed in Supplemental Materials and Methods.

Western blot

Standard procedures were applied (See Supplemental Materials and Methods; González-Guerrero et al. 2013). Primary antibodies to I κ B- α (Santa Cruz Biotech, sc-1643) and HMGB1 (Abcam, ab18256) were used. Antibodies to α -Tubulin (Sigma-Aldrich) were used to correct minor differences in protein loading.

Histological studies

Immunostaining was carried out in 3 μ m thick tissue sections that were deparaffinized and antigen retrieved. Endogenous peroxidase was blocked and sections incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies: rat polyclonal anti-mouse F4/80 (1:50; AbD Serotec, Bio-Rad MCA497);

rabbit anti-mouse CD3 (ready to use Flex monoclonal, DAKO); rabbit polyclonal anti-mouse p-JNK (1:100, Cell Signaling 4668), p-cJUN (1:250, Cell Signaling 3270), Stat3 (1:500, Cell Signaling 8768), Fn14 (1:50, Cell Signaling 4403), IRE1 α (1:350, Abcam ab48187) and HMGB1 (1:1000, Abcam ab18256). Image quantification was carried out with ImageProPlus software (MediaCybernetics, Bethesda, MD). Negative controls include non-specific immunoglobulin and no primary antibody (not shown). For TLR4 immunofluorescence tissue sections were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-TLR4 (1:100, Santa Cruz, sc-16240) and developed with Alexa Fluor™-488 (1:200, Life Technologies) for 1 h at room temperature. Tubular injury was evaluated in kidney tissue sections stained with hematoxylin–eosin by a pathologist (P.C) who was blinded to the nature of the samples. Evidence of cell injury (vacuolization, necrosis, nuclear alterations) and tubular damage atrophy, flattening, macrophages and epithelial cells and hyaline cast formation in lumen) were individually scored on a semiquantitative scale from 0 to 3. Results from each item were added to yield the overall tubular injury score (maximal value 21). Kidney fibrosis was quantified on Sirius red-stained tissue sections with ImageProPlus software. For a more detailed procedure information, see Supplemental Materials and Methods.

Cell cultures

The NRK 49F cell line (ATCC: CRL1570, American Type Culture Collection, Rockville, MD; USA) is derived from rat kidney fibroblasts. MCT cells are a cultured line of mouse proximal tubular epithelial cells originally obtained from Eric Neilson (Vanderbilt University, Nashville, TN; Haverty et al. 1988). Cells were grown in RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10 % decompemented fetal bovine serum (DFBS), 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin, in 5 % CO₂ at 37 °C. Cells were treated with the following stimuli and inhibitors: endotoxin-free CsA (Calbiochem, Merck Chemicals), stock solution made in ethanol (10 mg/ml); human TGF β 1 (Peprotech); TAK242 (Calbiochem, Merck Chemicals); glycyrrhizin (Sigma-Aldrich), stock solution made in RPMI (1 mM).

Results

Systemic administration of CsA increases renal TLR4 expression

We had previously found that engagement of TLRs, and particularly, TLR4 mediates CsA proinflammatory effects in cultured renal tubular cells (González-Guerrero et al.

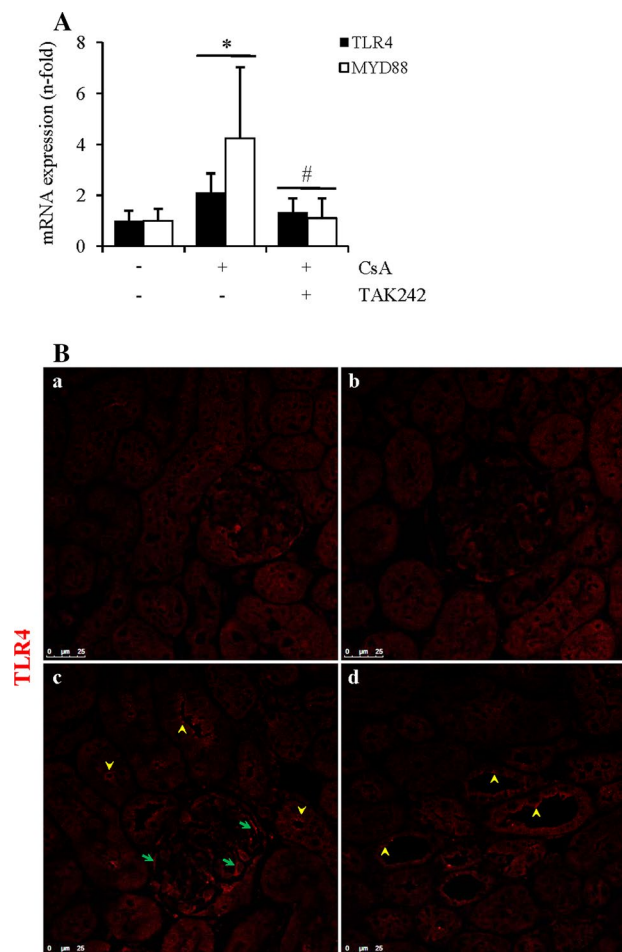
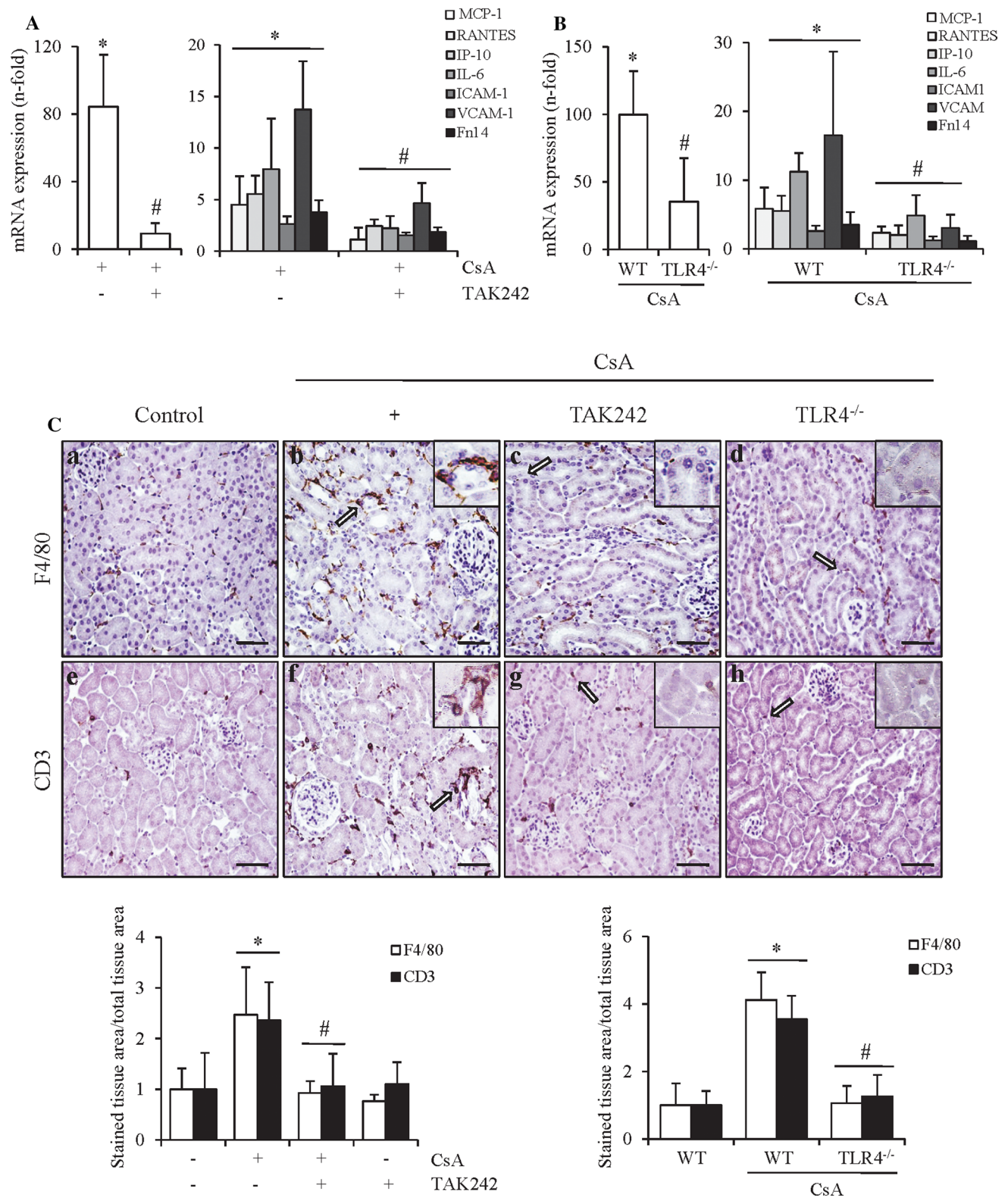


Fig. 1 Increase in TLR4 expression in CsA nephrotoxicity is prevented by pharmacological TLR4 inhibition with TAK242. **A** Kidney TLR4 and Myd88 mRNA expression was assessed by qRT-PCR in mice following 10 days of daily CsA or CsA plus the TLR4 inhibitor TAK242. Results were compared with control untreated mice. Mean \pm S.D. of 5–8 animals per group. * p < 0.03 versus control; # p < 0.03 versus CsA. **B** Evaluation of kidney TLR4 expression by immunofluorescence. In kidneys from CsA-treated mice, an increased TLR4 expression was found in the luminal face and cytoplasm of tubular cells (yellow arrowheads in **c** and **d**) and also in glomeruli (green heads in **c**), whereas mice co-treated with CsA and TAK242 **b** exhibited a similar TLR4 staining pattern as the control group (**a**). Original magnification \times 200. Scale bar 25 μ m (color figure online)

2013). Nevertheless, to date, there is no compelling evidence to prove that TLR4 has a role in vivo in promoting CsA-associated nephrotoxicity. In this regard, we have now implemented a mouse model of progressive CsA nephrotoxicity to explore whether TLR4 inhibition was nephroprotective.

Kidneys from mice treated with CsA for 10 days revealed higher mRNA levels of TLR4 and of the TLR adaptor molecule Myd88 than in control mice thus suggesting a sustained activation of the TLR4 pathway. By contrast, CsA-induced upregulation of TLR4 and Myd88 gene



expression normalized when TLR4 activity was regularly inhibited in mice treated with the pharmacological TLR4 inhibitor TAK242 (Fig. 1A). Consistent with these findings,

immunohistochemistry disclosed barely if any renal TLR4 staining in control mice, while CsA-treated mice showed an enhanced TLR4 expression in the luminal border and

Fig. 2 Pharmacological or genetic inhibition of TLR4 ameliorates kidney inflammation in CsA nephrotoxicity. Renal proinflammatory marker expression profiles in wt mice treated with CsA alone or cotreated with CsA and TAK242 for 10 days (**A**) or in TLR4^{-/-} mice treated with CsA for 10 days (**B**). MCP1, Rantes, IP10, IL-6, ICAM-1, VCAM-1 and Fn14 mRNA levels were assessed by qRT-PCR. Results are expressed as fold increase relative to control mice. Data shown are mean \pm SD * p < 0.01 versus control; # p < 0.01 versus CsA. **C** Leukocyte infiltration in the kidney detected by immunostaining of mononuclear F4/80-positive and T-lymphocyte CD3-positive cells after 10 days of CsA administration. Images are representative kidney tissue sections of the total set of mice analyzed and *bar charts* depict the mean \pm SD of the percentage of F4/80- and CD3-stained area in each group of mice (n = 5–8) expressed as fold change over control. *Inset* images show at higher magnification areas with positive staining for F480 or CD3 (indicated by *arrows*) in both mice treated with CsA alone (**b**, **f**) and CsA plus TAK242 (**c**, **g**), or in TLR4^{-/-} mice (**d**, **h**). Original magnification \times 200. Scale bar 100 μ m. * p < 0.01 versus control; # p < 0.01 versus CsA

cytoplasm of tubular cells and also in glomeruli, which was not observed in kidneys of mice treated with both CsA and TAK242 (Fig. 1B).

TLR4 mediates renal inflammation in CsA nephrotoxicity

We previously showed that in cultured tubular cells TLR4 targeting prevented CsA-induced proinflammatory cytokine synthesis (González-Guerrero et al. 2013). We now show that in vivo inhibition of TLR4 with TAK242 in mice treated with CsA for 10 days resulted in a significant reduction in the kidney mRNA expression of promoters of renal inflammation, such as the cytokine IL-6, chemokines MCP-1, Rantes and IP-10; the endothelial activation markers ICAM-1 and VCAM-1, and also the TWEAK receptor Fn14, a key mediator of renal inflammation and injury (Fig. 2A). To corroborate these results, we took advantage on a second model of TLR4 targeting developed in TLR4^{-/-} mice treated with CsA. In this group of animals, CsA-induced gene expression of proinflammatory cytokines and factors was also reduced (Fig. 2B). Enhanced renal production of chemokines contributes to the local inflammatory reaction by favoring the recruitment of circulating immunocompetent cells. Pharmacological inhibition or deletion of TLR4 prevented the CsA-induced kidney recruitment of F4/80 + mononuclear phagocytes and CD3 + T lymphocytes, thus demonstrating that TLR4 engagement promotes the CsA-induced inflammatory responses (Fig. 2C).

CsA triggering of proinflammatory signaling pathways depends on TLR4

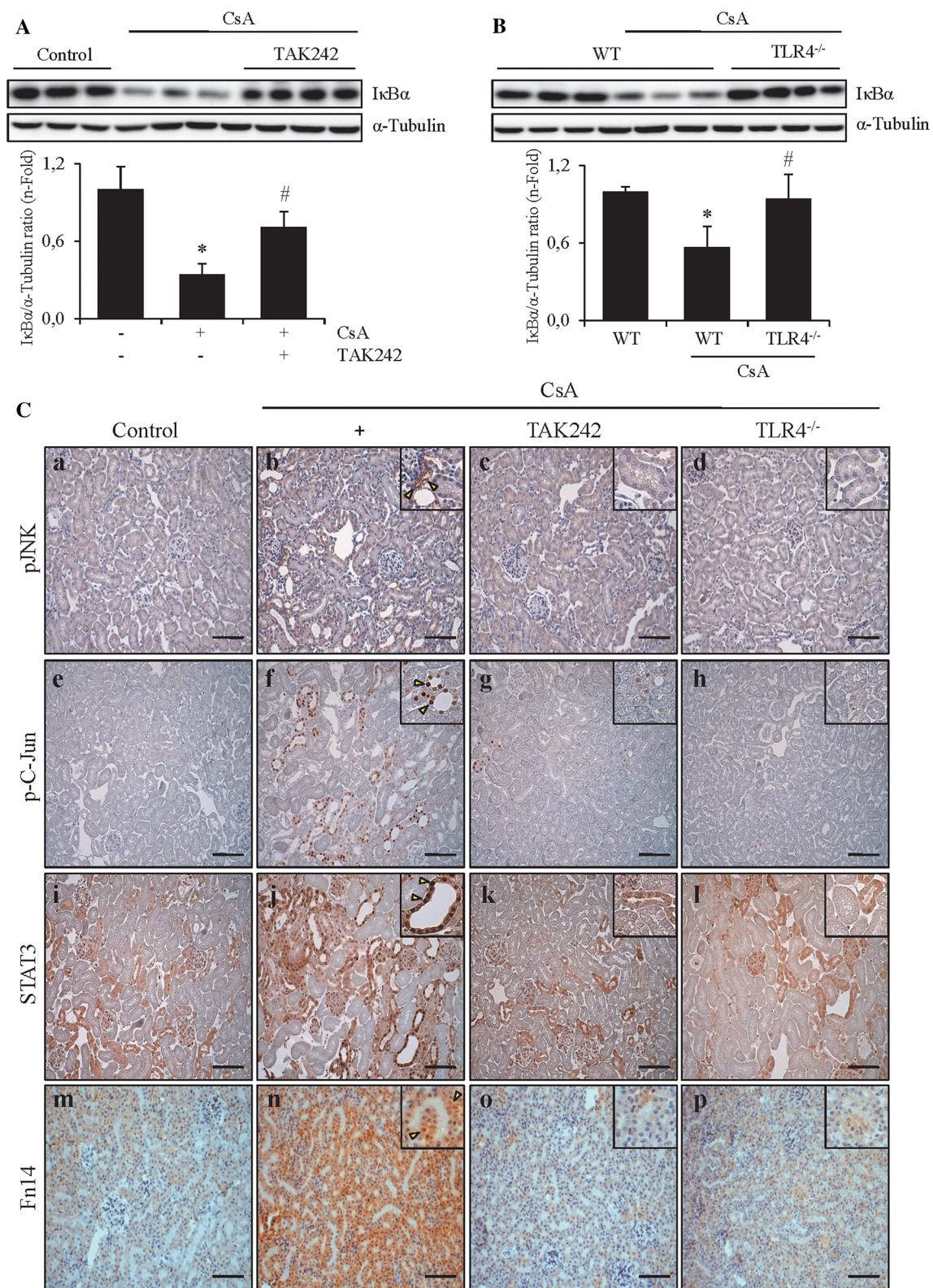
Our previous studies introduced the novelty that in cultured renal tubular cells, CsA activates the JAK2/STAT3 pathway and JNK to induce the synthesis of NF- κ B-dependent

proinflammatory cytokines (González-Guerrero et al. 2013). Western blot analysis of kidney protein extracts showed that in vivo TLR4 inhibition with TAK242 or TLR4 deficiency prevented CsA-induced I κ B α degradation, a step required for NF- κ B activation (Fig. 3A, B). Kidney immunohistochemistry also demonstrated that in vivo functional or genetic inhibition of TLR4 abolished CsA-induced cytoplasmic JNK phosphorylation/activation in tubular cells. In accordance with this finding, TLR4 targeting also prevented the phosphorylation/activation and nuclear translocation of the JNK substrate c-jun which heterodimerizes to form the AP-1 transcription factor (Fig. 3C). Similarly, in vivo CsA increased tubular cell cytosolic and especially nuclear STAT-3 levels, suggesting an upstream JAK2 activation. Once again, TLR4 targeting prevented CsA-induced STAT-3 expression and nuclear translocation (Fig. 3C). Likewise, the CsA-induced increase in Fn14 expression was also prevented by TAK242 and in TLR4^{-/-} mice (Fig. 3C).

There is accumulating evidence that CsA triggers the unfolding protein response (UPR) in kidney tubular cells, contributing to CsA-induced cytokine expression and potentially to CsA nephrotoxicity (Du et al. 2009; Carlisle et al. 2012). We now explored whether in vivo TLR4 targeting influences the CsA-induced renal UPR activation. Kidney immunohistochemistry showed that CsA induced the nuclear redistribution of IRE1 in tubular cells, denoting IRE1 activation, and this was prevented by TAK242 or in TLR4^{-/-} mice (Fig. 4A). On the other hand, analysis of the PERK pathway of the UPR showed higher CHOP and ATF3 mRNA levels in CsA-treated animals compared to control mice, and this was also prevented by TAK242 or in TLR4^{-/-} mice (Fig. 4B, C).

TLR4 targeting protects against CsA kidney fibrosis

Tubulointerstitial fibrosis is a hallmark of chronic CsA nephrotoxicity. To explore whether TLR4 signaling regulates CsA-induced kidney fibrosis, we evaluated the expression of typical profibrotic genes and the extent of collagen deposition. Mice treated with CsA for 10 and 20 days showed a progressive increase in the transcription of renal type 1 collagen (COL-1), fibronectin 1 (FN-1), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and transforming growth factor β 1 (TGF β 1) compared to control mice. By contrast, TAK242 inhibited the CsA-induced kidney synthesis of these profibrotic factors (Fig. 5A), and TLR4 deficient mice were also protected (Fig. 5B). Tubulointerstitial collagen deposition barely changed in mice on CsA for 10 days, but was severely increased by day 20 (Fig. 5C). The impact of TLR4 inhibition on CsA-induced renal fibrogenesis was studied in TLR4^{-/-} mice after 20 days of daily CsA. At this point, CsA TLR4^{-/-} mice



had significantly lower interstitial collagen deposition than CsA wild-type mice (Fig. 5C). To characterize potential, direct CsA-induced profibrotic effects that are TLR4-dependent, we studied NRK-49F renal fibroblasts. CsA

did not modify extracellular matrix synthesis (COL-1, FN-1) in these cells (Fig. 5D). By contrast, CsA increased the synthesis of PAI-1, a major driver of kidney fibrosis (Ma and Fogo 2009; Fig. 5E). However, pharmacological

Fig. 3 Pharmacological or genetic inhibition of TLR4 reduces proinflammatory signaling in CsA nephrotoxicity. **A, B** I κ B α degradation was assessed by western blot as indicative of NF- κ B activation in CsA nephrotoxicity induced in wt mice treated with CsA or cotreated with CsA and TAK242 (**A**) or in TLR4^{-/-} mice (**B**). Images illustrate the I κ B α behavior in representative animals of each groups and *graphs* show data expressed as the mean \pm SD from the entire set of animals studied ($n = 5-8$). * $p < 0.01$ versus control; # $p < 0.01$ versus CsA. **C** Representative immunohistochemistry of activated proinflammatory signaling pathways in kidneys from control and CsA-treated wt mice and CsA-treated TLR4^{-/-} mice. *Inset* images show at higher magnification relevant changes, namely increased tubular p-JNK and Fn14 levels as well as p-cJUN and STAT nuclear translocation induced by CsA (pointed by *arrows* in **b, f, i, n**) that were greatly attenuated or impeded by TAK242 (**c, g, k, o**) or TLR4^{-/-} targeting (**d, h, l, p**). Original magnification $\times 200$. Scale bar 100 μ m

blockade of TLR4 did not significantly modify the CsA-dependent upregulation of PAI-1 gene expression. Overall, these results suggest that TLR4 protection from CsA-induced kidney fibrosis does not depend on direct modulation of extracellular matrix proteins or profibrotic factors in fibroblasts. By contrast, TLR4 inhibition in fibroblasts resulted in a decreased CsA-induced MCP1

expression (Fig. 5F), supporting the concept that the beneficial impact of TLR4-targeting on CsA-induced kidney fibrosis may be driven by inhibition of TLR4 proinflammatory signaling (Fig. 5F).

TLR4 inhibition attenuates tissue injury and renal function loss induced by CsA

To ascertain whether the full spectrum of CsA nephrotoxicity was dependent on TLR4 activity, we monitored kidney damage and function. Exposure to CsA for 10 days increased, and treatment with TAK242 or TLR4 absence inhibited, gene expression of the tubular injury markers KIM1 and NGAL (Fig. 6A, B). Moreover, TLR4 inhibition or deletion protected from the progressive histological tubular damage induced by CsA at 10–20 days, characterized by tubular dilation, flattening, necrosis and atrophy, cast formation and gross cytoplasmic vacuolization of tubular cells (Fig. 6C–E). Finally, TLR4 inhibition also prevented the decrease in renal function, as shown by lower plasma urea levels compared to CsA-treated animals (Fig. 6F–G).

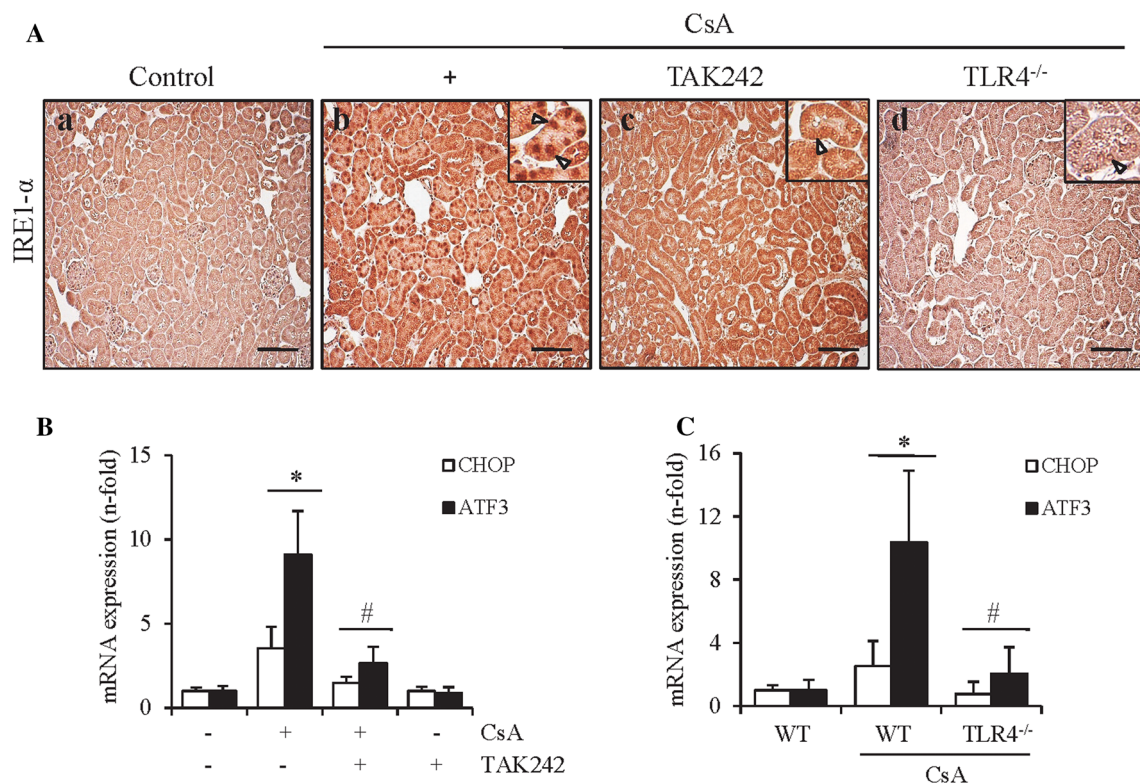


Fig. 4 Renal activation of the UPR by CsA is decreased in mice with pharmacological or genetic inhibition of TLR4. **A** Representative immunohistochemistry of tubular IRE1 α expression in wt mice that were left untreated (control) (**a**) or treated with CsA alone (**b**) or CsA/TAK242 (**c**) and also CsA-treated TLR4^{-/-} mice (**d**). *Inset* images show at higher magnification the CsA-induced IRE1 α activa-

tion (pointed by *arrows*) (**b**) which was otherwise prevented by TLR4 targeting (**c, d**). Original magnification $\times 200$. Scale bar 100 μ m. **B, C** Renal gene expression of the UPR (PERK branch) members CHOP and ATF3 in CsA alone or CsA/TAK242 treatment (**B**) or TLR4^{-/-} (**C**) mice assessed by q-RT-PCR. Data shown are the mean \pm SD ($n = 5-10$ per group). * $p < 0.01$ versus control; # $p < 0.01$ versus CsA

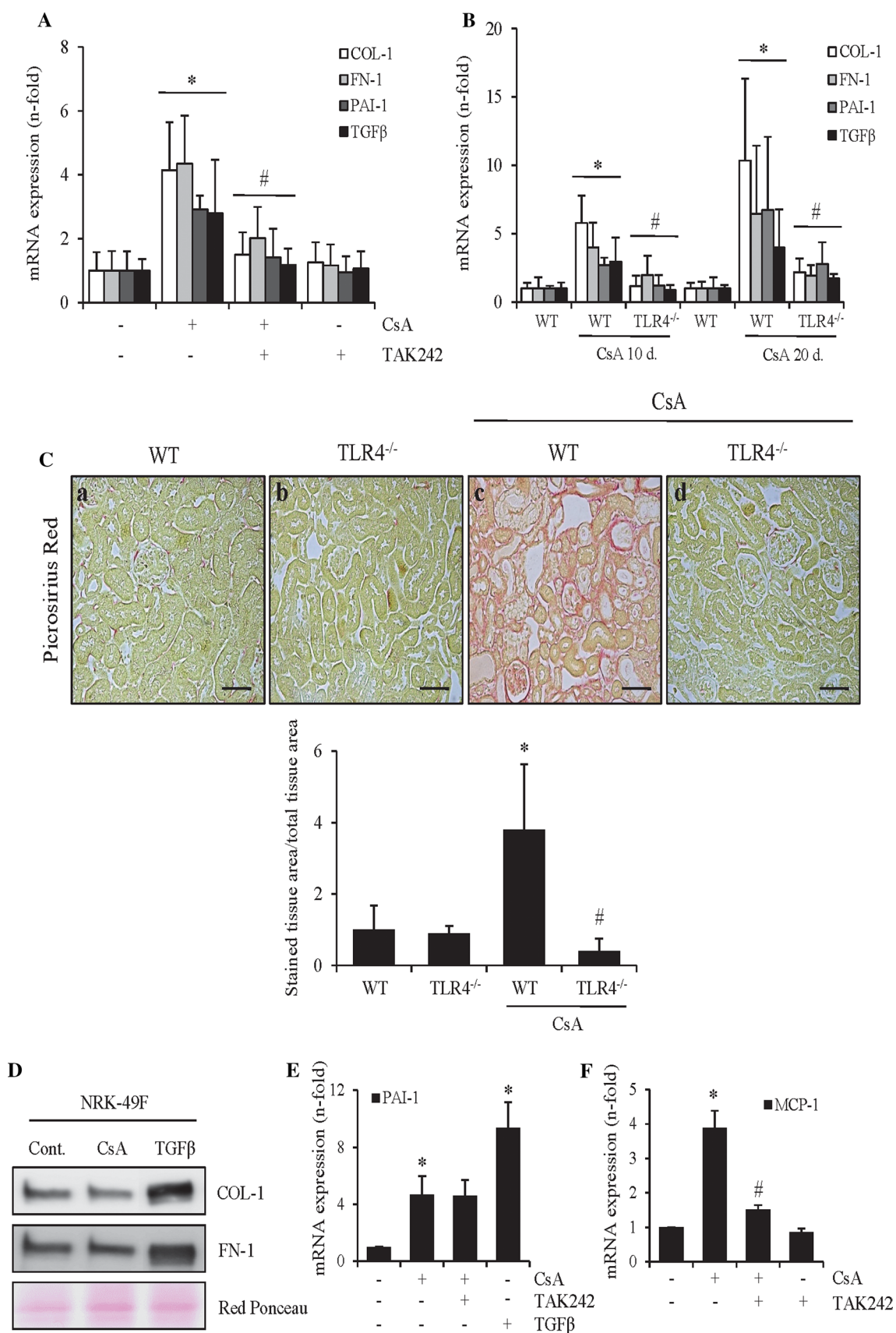


Fig. 5 Renal CsA-induced fibrosis is prevented by pharmacological or genetic TLR4 targeting. **A, B** Renal gene expression of key profibrotic genes (COL-1, FN-1, PAI-1, TGF β 1) assessed by q-RT-PCR in CsA- and CsA/TAK242-treated (* p < 0.01 vs. control; # p < 0.02 vs. CsA) (**A**) or in TLR4 $^{-/-}$ mice (* p < 0.05 vs. control; # p < 0.05 vs. CsA) (**B**). Data shown are mean \pm SD (n = 5–10 per group). **C** Kidney tubulointerstitial collagen accumulation assessed by picrosirius red staining in wt and TLR4 $^{-/-}$ mice following 20-day treatment with CsA. Magnification \times 200. *Bar chart* shows the percentage of picrosirius red-stained area and results are expressed as fold change over control. * p < 0.01 versus control; # p < 0.01 versus CsA (n = 5 mice per group). Original magnification \times 200. *Scale bar* 100 μ m. **D** CsA does not induce the synthesis of extracellular matrix proteins in renal fibroblasts. NRK-49F cells were treated with 2.5 μ g/ml CsA for 48 h. Type 1 collagen 1 (COL1) and fibronectin 1 (FN1) were assessed by western blot in cell-culture-conditioned media. Figure shows a representative experiment (n = 3). **E** CsA-induced PAI-1 gene expression is not affected by TLR4 inhibition in renal fibroblasts. NRK-49F cells were treated with 2.5 μ g/ml CsA for 48 h. PAI-1 mRNA expression was assessed by q-RT-PCR. Results are expressed as the mean \pm SD. * p < 0.05 versus control (n = 3). **F** Pharmacological inhibition of TLR4 prevents CsA-induced MCP-1 gene synthesis in renal fibroblasts. NRK-49F cells were treated with 2.5 μ g/ml CsA alone or in the presence of 10 μ M TAK242 (added 1 h before the stimulus) for 6 h. MCP-1 mRNA expression was assessed by q-RT-PCR. Results are expressed as the mean \pm SD. * p < 0.05 versus control; # p < 0.05 versus CsA (n = 3)

CsA-induced HMGB1 intracellular transit precedes TLR4 activation

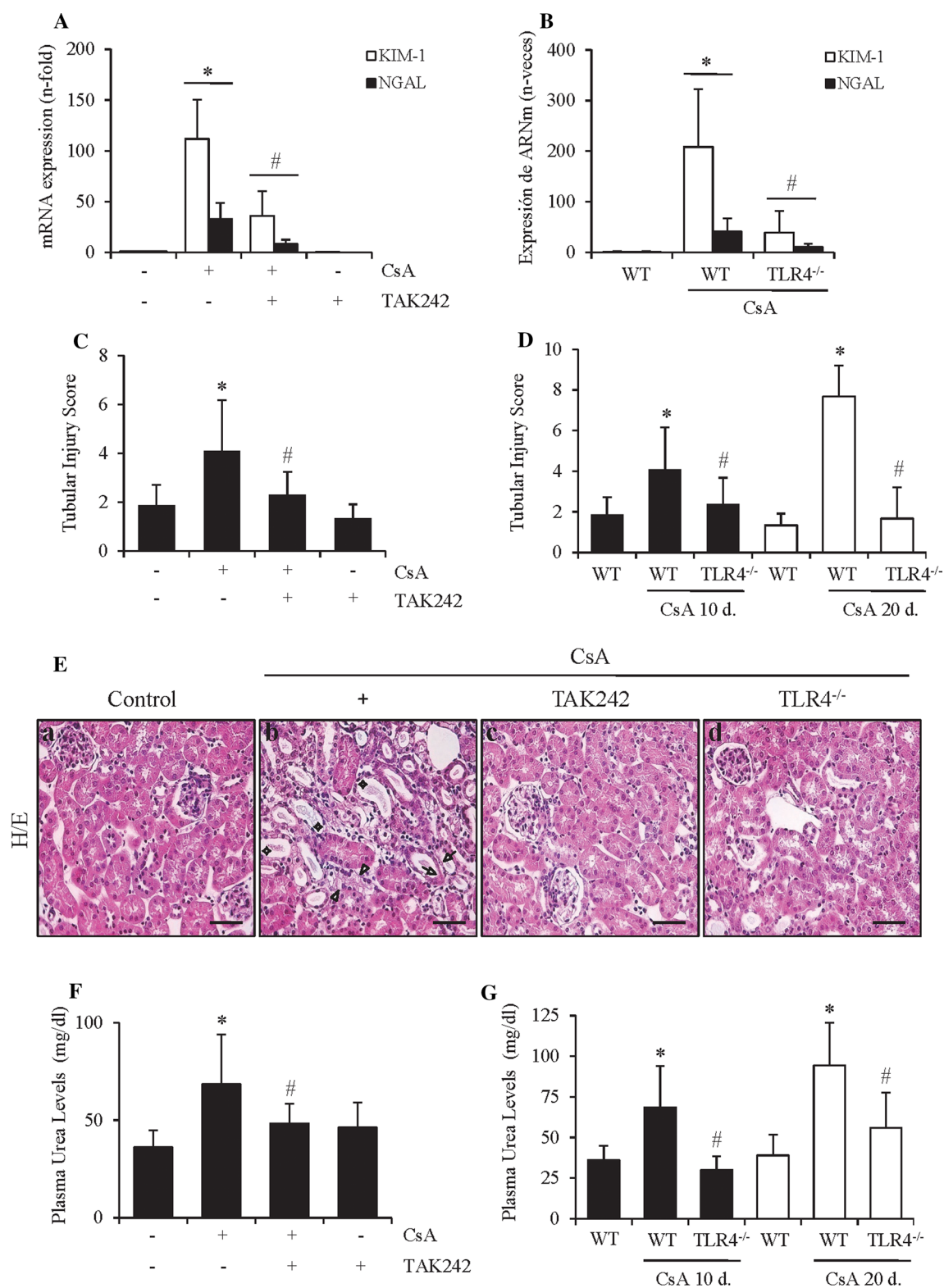
HMGB1 is a danger-associated molecular pattern that may activate TLR2 and TLR4 (Wu et al. 2010) and, as TLR4, has been involved in promoting kidney injury (Wu et al. 2007, 2010). Direct stimulation of TLR4 may result in active HMGB1 secretion; however, its passive leakage from damaged cells is also possible before ligation to TLR4. We addressed the regulation of HMGB1 in mice treated with CsA. In vivo CsA administration did not modify kidney HMGB1 mRNA (Fig. 7A) and protein expression (not shown). However, immunohistochemistry showed that CsA for 10 days decreased nuclear HMGB1 content in tubular cells (Fig. 7B). Consistent with this observation, CsA increased HMGB1 in the cytoplasmic fraction of kidney protein extracts when compared to control mice (Fig. 7C). TAK242 did not prevent the loss of nuclear HMGB1 or the increase in cytoplasmic HMGB1, thus suggesting that HMGB1 misallocation was TLR4-independent (Fig. 7B, C). In this regard, the hypothesis that CsA could promote the release of HMGB1 from cells, thus leading to TLR4 activation was addressed in cultured murine tubular cells exposed to CsA. Western blot assays confirmed that in control cultured tubular cells, HMGB1 was confined to the nucleus, whereas CsA led to the nuclear-cytoplasmic translocation and secretion of HMGB1, thus decreasing nuclear HMGB1 content (Fig. 7D). In agreement with in vivo observations, TLR4 inhibition with TAK242 did not prevent the secretion of HMGB1 in response to CsA,

which is also consistent with HMGB1 release preceding TLR4 activation (Fig. 7E). In this regard, ligation of TLR4 with LPS did not promote HMGB1 secretion, thus further suggesting that HMGB1 is released by a mechanism independent from TLR4 activation in tubular cells which differs from the reported TLR4-dependent release of HMGB1 in LPS-stimulated macrophages (Wang et al. 1999; Fig. 7E). In this regard, prevention of CsA-induced apoptosis by the general caspase inhibitor z-VAD-fmk neither precluded the release of HMGB1 nor shifted the apoptotic cells toward necrosis (Justo et al. 2003 and results not shown), thus ruling out the occurrence of passive leakage from dying cells (Fig. 7D). Remarkably, inhibition of HMGB1 nuclear exportation with glycyrrhizin resulted in lower CsA-induced gene expression of the representative proinflammatory chemokine MCP-1 (Fig. 7F). Taken together, these data suggest that in vivo CsA could directly induce secretion by tubular cells of HMGB1, a TLR4 ligand that may be involved in CsA-induced TLR4 activation.

Discussion

The main finding is that in vivo TLR4 targeting in mice, either by pharmacological or genetic means, successfully prevented CsA-induced kidney inflammation, tubulointerstitial injury and fibrosis and loss of renal function. In fact, CsA nephrotoxicity depends almost exclusively on an intact TLR4 signaling pathway.

Inflammation has been identified as an important pathogenic mechanism in several models of kidney injury, including drug nephrotoxicity, acute kidney injury and chronic obstructive damage. Thus, proinflammatory signaling pathways, soluble cytokines and chemokines, leukocyte cell subsets and endothelial activation, have been successfully targeted in experimental models to inhibit kidney injury and fibrosis progression (Sanz et al. 2010; Kitching and Holdsworth 2011; Lee et al. 2011; Borthwick et al. 2013; Cao et al. 2015; Zafrani and Ince 2015). By contrast, albeit inflammation is associated to CsA nephrotoxicity in experimental models and clinical samples, there is scarce information derived from experiments targeting inflammatory factors in vivo that provide insights into a potentially causative contribution of inflammation to CsA nephrotoxicity. We previously observed that inflammation is an early event in a murine model of accelerated CsA nephrotoxicity and cell culture studies suggested the participation of TLR4 as a mediator of CsA-induced proinflammatory responses in tubular cells (González-Guerrero et al. 2013). However, until now, it was unknown whether TLR4 also mediates proinflammatory responses in CsA nephrotoxicity in vivo and whether this contributed to the functional and histological kidney abnormalities caused by CsA. The present results



show that in vivo targeting of TLR4 by small molecules or genetic means reduced the renal transcription of a complete set of NF- κ B-dependent cytokines and chemokines (MCP-1, Rantes, IP-10, IL-6) and endothelial activation

markers (VCAM-1, ICAM-1). Moreover, these findings were accompanied by a milder kidney infiltration by mononuclear phagocytes and T lymphocytes. The synthesis of many proinflammatory cytokines follows the activation

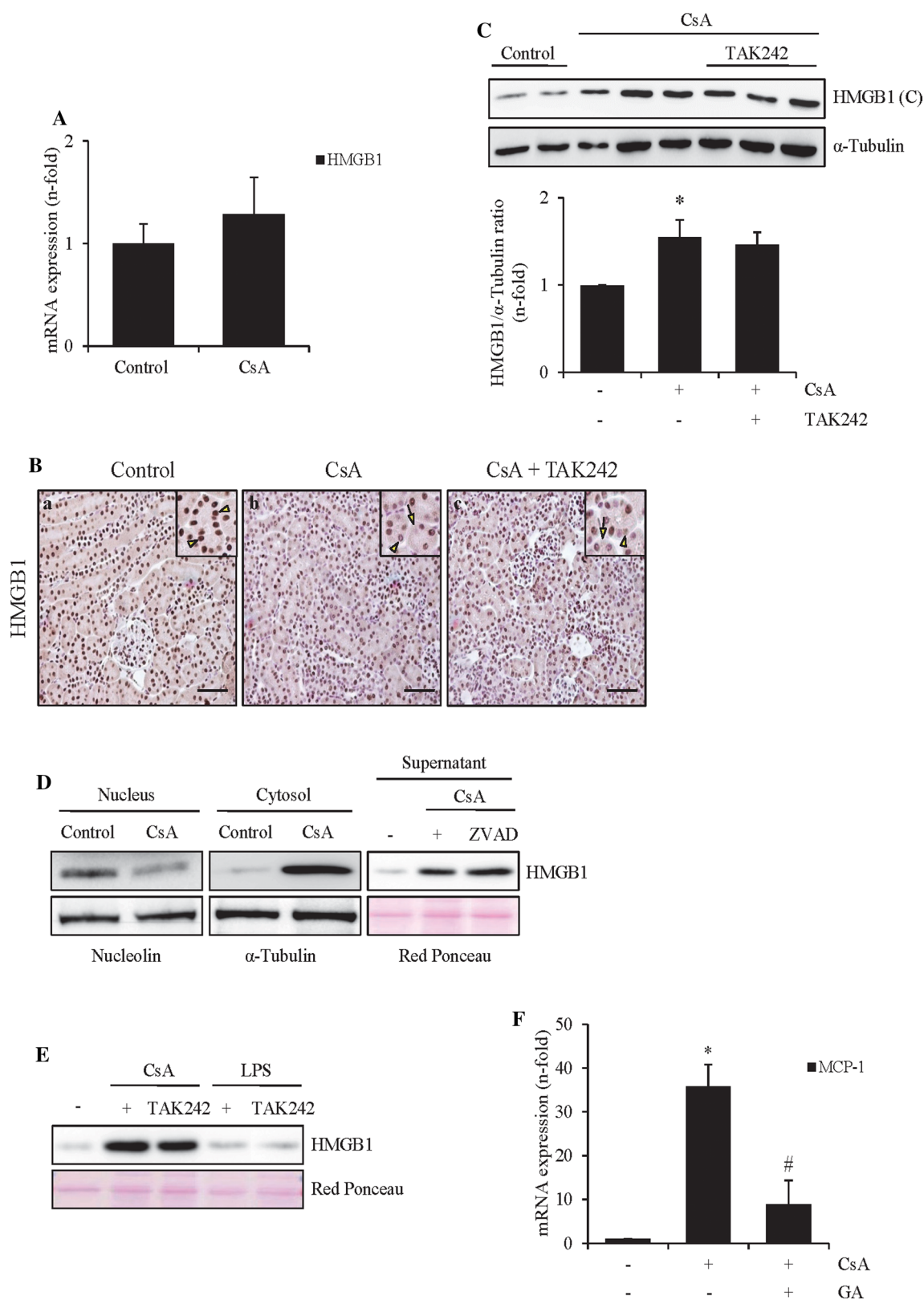
Fig. 6 Pharmacological or genetic inhibition of TLR4 improved CsA-induced tubulointerstitial injury and renal dysfunction. Daily CsA injections were administered in wt mice for 10 days and in TLR4^{-/-} mice for 10 days (**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.05 vs. CsA.) or 20 days (**p* < 0.01 vs. control; #*p* < 0.01 vs. CsA). **A, B** Renal gene expression of key tubular damage markers. KIM-1 and NGAL mRNA expression was assessed by q-RT-PCR in wt mice under treatment with CsA or CsA/TAK242 (**p* < 0.01 vs. control; #*p* < 0.01 vs. CsA) (**A**) and in CsA-treated TLR4^{-/-} mice (**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.01 vs. CsA) (**B**). Data shown are mean ± SD (*n* = 5–10 per group). **C, D** Semiquantitative histopathological assessment of kidney tubular injury in hematoxylin/eosin (H/E)-stained kidney sections by a tubulointerstitial injury score. Daily CsA injections were administered in wt mice for 10 days (**p* < 0.01 vs. control; #*p* < 0.05 vs. CsA) (**C**) or in TLR4^{-/-} mice for 10 (**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.05 vs. CsA.) or 20 days (**p* < 0.01 vs. control; #*p* < 0.01 vs. CsA) (**D**). **E** Representative images of H/E-stained kidney structures from the same group of animals studied in **C** and **D**. Areas of tubular injury were characterized by dilation and cast formation (diamonds), vacuolization (arrowheads) and loss of tubular cells and apoptosis (arrows) (**b**). Similar to control kidneys (**a**), renal tissue from TAK242 treated or TLR4^{-/-} mice show a preserved renal structure (**c, d**). Original magnification ×200. Scale bar 100 μm. **F, G** Plasma urea levels as marker of renal function in response to CsA and TAK242 (**F**) or in TLR4^{-/-} mice (**G**). Mean ± SD (*n* = 5–8), **p* < 0.02 versus control; #*p* < 0.02 versus CsA

of signaling pathways and transcription factors, such as c-Jun and STAT3, which interact and work together with NF-κB (Schulze-Osthoff et al. 1997; Fujioka et al. 2004; de Borst et al. 2009; Grivennikov and Karin 2010). C-Jun mediates inflammatory responses when activated by phosphorylation following activation of the MAPKs ERK, p38 and JNK. Indeed, blockade of JNK and c-Jun prevented the renal upregulation of proinflammatory factors and leukocyte infiltration in kidney ischemia–reperfusion (de Borst et al. 2009; Kanellis et al. 2010) and CsA-induced inflammatory responses in cultured renal tubular cells (González-Guerrero et al. 2013). MAPKs are typically activated by TLR signaling during the innate immune response (González-Guerrero et al. 2013). Thus, a TLR4-dependent increase in JNK was reported in experimental cisplatin nephrotoxicity (Zhang et al. 2008). In agreement with these findings, we have now confirmed that in vivo inhibition of TLR4 activity or expression also prevented the CsA-dependent induction of tubular JNK and c-Jun activation. The JAK2/STAT3 pathway is associated with kidney inflammation and fibrosis (Ortiz-Muñoz et al. 2010; Wang et al. 2010a, b; Koike et al. 2014). Indeed, CsA activates the JAK2/STAT3 pathway in mouse kidney, and JAK2 inactivation decreased tubular cell injury and apoptosis (Neria et al. 2009). Moreover, JAK2 inhibition blocked CsA-dependent proinflammatory activities in cultured tubular cells (González-Guerrero et al. 2013). Engagement of JAK2 or the JAK2/STAT3 pathway downstream of TLR4 was first reported in macrophages and also occasionally observed in other cell types (Okugawa et al. 2003; Lee et al. 2013; Zhang et al. 2015). We now show that

in vivo TLR4 targeting suppresses the CsA-induced tubular STAT3 activation and nuclear translocation, suggesting that JAK2/STAT3 activation is TLR4-dependent in CsA nephrotoxicity in vivo. In this regard, we also observed that TLR4 blockade also inhibited CsA-induced expression of kidney IL-6, and IL-6 is a classical JAK2/STAT3 activator (O’Shea et al. 2013). Taken together, these results support the concept that in vivo TLR4 inhibition could reduce CsA-induced renal inflammation by downmodulating the CsA-elicited JNK/c-JUN and JAK2/STAT3 activation, which are TLR4-dependent responses.

The receptor Fn14 and its ligand, TWEAK, constitute a key proinflammatory axis in the kidney (Sanz et al. 2008; Rayego-Mateos et al. 2013). Fn14 regulates many proinflammatory signaling pathways resulting in NF-κB activation (Sanz et al. 2008). Fn14 expression is increased in acute and chronic kidney injury and TWEAK/Fn14 targeting reduces kidney chemokine expression, tubular damage and fibrosis (Sanz et al. 2008; Sanchez-Niño et al. 2013; Ucero et al. 2013a, b). We have now shown for the first time that kidney Fn14 is upregulated in CsA nephrotoxicity in a TLR4-dependent fashion. Since inflammatory cytokines increase Fn14 synthesis, and Fn14 signaling recruits MAPK/JNK and JAK2/STAT3 signaling (Justo et al. 2006; Sanz et al. 2009; Ucero et al. 2013a, b), Fn14 engagement following TLR4 activation may constitute an amplification loop of the inflammatory process in CsA nephrotoxicity.

In renal tubular cells, CsA induces endoplasmic reticulum stress which triggers the UPR (González-Guerrero et al. 2013). We now show that in vivo TLR4 targeting prevents CsA-mediated UPR responses potentially involved in renal inflammation and damage, namely IRE1α, CHOP and ATF3 upregulation. IRE1α is a UPR sensor that promotes the production of proinflammatory cytokines in macrophages following TLR4 activation and activates JNKs in several cell types (Urano et al. 2000; Martinon et al. 2010; Zhu et al. 2014). In this regard, IRE1α mediates CsA-induced inflammation in cultured renal tubular cells (González-Guerrero et al. 2013). On the other hand, CHOP and ATF3 are engaged by the PERK pathway of the UPR. CHOP regulates the transcription of kidney proapoptotic genes and promotes renal ischemia/reperfusion injury in mice (Dong et al. 2014; Noh et al. 2015). ATF3 activation in response to TLR4 engagement negatively regulates TLR4 signaling (Gilchrist et al. 2006; Whitmore et al. 2007) and the inflammatory reaction and apoptosis following murine kidney ischemia/reperfusion (Li et al. 2010). Moreover, ATF3 overexpression in kidney tubular cells attenuates CsA-induced CHOP synthesis and cell death (Choi et al. 2014). Overall, results presented herein suggest that CsA-induced UPR in kidney cells is TLR4-dependent in vivo and may lead to amplification of inflammation and cell death, despite the compensatory ATF3 response. Thus,



TLR4 targeting decreases the activation of potentially injurious pathways such as IRE1/JNK and PERK/CHOP and makes no longer necessary the negative feed-back loop represented by ATF3 activation.

CsA nephrotoxicity is characterized by chronic progressive fibrosis. Results of the present paper highlight a role of TLR4 in CsA-induced kidney fibrosis. Thus, in vivo TLR4 targeting downmodulated CsA-induced kidney profibrotic

Fig. 7 Secreted HMGB1 participates in the CsA-induced TLR4 activation. **A** CsA nephrotoxicity does not change HMGB1 gene expression. HMGB1 mRNA levels were evaluated by q-RT-PCR in kidneys from control and CsA-treated mice. Mean \pm SD ($n = 5-8$). **B** Representative immunohistochemistry images of HMGB1 in CsA nephrotoxicity. *Inset* images show at higher magnification tubular cells with normal (yellow arrowheads in control) or diminished or even absent (yellow arrowheads in CsA or CsA plus TAK242) nuclear HMGB1. Original magnification $\times 200$. Scale bar 100 μ m. **C** Cytoplasmic HMGB1 content in kidney protein extracts assessed by western blot after 10 days of CsA or TAK242/CsA treatment. Mean \pm SD ($n = 5-8$), $*p < 0.05$ versus control. **D** Nuclear to cytoplasmic HMGB1 transit induced by CsA in cultured renal tubular cells. The HMGB1 content was measured by western blot in nuclear and cytoplasmic protein extracts as well as in the extracellular medium of MCT cells treated for 24 h with 10 μ g/ml CsA alone or in the presence of the apoptosis inhibitor z-vad-fmk (ZVAD). The figure shows a representative experiment from a total of three independent experiments. **E** Representative western blot of HMGB1 in supernatants of MCT cells stimulated with 10 μ g/ml CsA or 1 μ g/ml LPS for 24 h in the presence or absence of TAK242 added 1 h before CsA stimulation. **F** MCP1 mRNA levels were evaluated by q-RT-PCR in MCT cells incubated with 10 μ g/ml CsA alone or pretreated with 1 mM glycyrrhizin for 6 h. Bar graphs represent the mean \pm SD of three independent experiments. $*p < 0.05$ versus control; $^{\#}p < 0.05$ versus CsA ($n = 3$) (color figure online)

and extracellular matrix gene expression and collagen deposition. A reduced renal fibrosis was previously reported in obstructed kidneys from TLR4^{-/-} mice or in obstructed wild-type kidneys transplanted into TLR4^{-/-} recipient mice, suggesting a role for TLR4 as a mediator of renal fibrosis (Wang et al. 2010a, b; Campbell et al. 2011). However, persistent tubulointerstitial inflammation is a fundamental contributor to the development of kidney fibrosis (Meng et al. 2014). Thus, protection from kidney fibrosis in TLR4-targeted mice may result from a direct effect of TLR4 on fibrosis or from decreased inflammation leading to decreased fibrosis. We explored direct CsA-induced profibrotic effects on kidney fibroblasts but found no evidence of direct TLR4-mediated modulation of pro-fibrotic events in fibroblasts. Thus, we hypothesize that protection afforded by TLR4 targeting against CsA-induced kidney fibrosis may be a consequence of decreased inflammation or decreased inflammation-induced tubular cell injury. In this regard, soluble mediators of inflammation may cause tubular cell injury (Meng et al. 2014; Borthwick et al. 2013; Justo et al. 2006) and TLR4 targeting prevented early tubular dysfunction, morphological changes and apoptosis in our in vivo model and cultured tubular cells.

A fact deserving discussion is how CsA activates TLR4. In vivo administration of CsA upregulated kidney TLR4 expression in epithelial cells, in agreement with findings in other forms of inflammation-induced tissue injury (El-Achkar et al. 2006; Zhang et al. 2008). While

TLR4 upregulation after inflammation may potentiate the deleterious effects of CsA, in cultured tubular cells CsA elicited an early TLR4-mediated cytokine response (González-Guerrero et al. 2013) without increasing TLR4 gene expression (results not shown), suggesting that CsA nephrotoxicity may rely on constitutive TLR4 expression activated in response to changes in the availability of endogenous TLR4 ligands. In this regard, we showed that CsA mobilizes HMGB1 in kidney and that in cultured tubular cells the CsA-dependent secretion of HMGB1 is independent from TLR4 and also from the known lethality of CsA in this cell type, which can be prevented by caspase inhibitors (Justo et al. 2006). In addition, functional inhibition of the CsA-induced HMGB1 secretion prevented MCP1 synthesis. Although these results suggest the involvement of HMGB1 in mediating CsA-dependent TLR4 activation, they do not preclude the possibility that HMGB1 may also activate TLR2 and RAGE receptors, or that additional TLR4 ligands are involved. Biglycan and HSP70 are additional endogenous TLR4 ligands intrinsically associated to inflammation. Despite not specifically addressed in this work, it is conceivable that not just one, but a set of TLR4 ligands may either initiate or help to maintain TLR4 signaling during the CsA nephrotoxicity. In such a way, TLR4 expression may arise as a limiting step governing CsA-induced kidney injury, and as such, it could be considered as a key pharmacological target in CsA nephrotoxicity.

We have focused on CsA as model CNI since it is the only CNI included in the WHO list of essential medicines. However, tacrolimus elicits similar proinflammatory and damage mechanisms in cultured tubular cells (Berzal et al. 2012; González-Guerrero et al. 2013) and in vivo tacrolimus causes nephrotoxicity with similar characteristics to CsA (Naesens et al. 2009; Issa et al. 2013).

In conclusion, in this paper, we demonstrated for the first time a direct implication of TLR4 signaling in the CsA-induced kidney inflammation, injury and fibrosis in vivo, and this opens the possibility of decreasing CsA nephrotoxicity by preventing TLR4 activation. Additional characterization of the precise TLR4 ligand or ligands involved may expand the range of potential therapeutic interventions to be explored.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España): FEDER funds ISCIII RETIC REDINREN RD12/0021, PI11/02242, PI13/00047, PI14/00386, PI15/01460; Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid (CIFRA S2010/BMD-2378); Sociedad Española de Nefrología. Salary support: REDINREN to CG-G; Universidad Autónoma de Madrid to JE; Programa Intensificación Actividad Investigadora (ISCIII/Agencia Laín-Entralgo/CM) to AO; Contrato Miguel Servet (ISCIII) to AMR.

Compliance with ethical standards

Ethical approval All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Berzal S, Alique M, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Ramos AM (2012) GSK3, snail, and adhesion molecule regulation by cyclosporine A in renal tubular cells. *Toxicol Sci* 127(2):425–437
- Borthwick LA, Wynn TA, Fisher AJ (2013) Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1832(7):1049–1060
- Campbell MT, Hile KL, Zhang H, Asanuma H, Vanderbrink BA, Rink RR et al (2011) Toll-like receptor 4: a novel signaling pathway during renal fibrogenesis. *J Surg Res* 168(1):e61–e69
- Cao Q, Harris DC, Wang Y (2015) Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiology* 30(3):183–194
- Carlisle RE, Heffernan A, Brimble E, Liu L, Jerome D, Collins CA et al (2012) TDAG51 mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 303(3):F467–F481
- Choi YM, Cho HY, Anwar MA, Kim HK, Kwon JW, Choi S (2014) ATF3 attenuates cyclosporin A-induced nephrotoxicity by down-regulating CHOP in HK-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 448(2):182–188
- de Borst MH, Prakash J, Sandovici M, Klok PA, Hamming I, Kok RJ et al (2009) c-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulo-interstitial inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 331(3):896–905
- Dong B, Zhou H, Han C, Yao J, Xu L, Zhang M et al (2014) Ischemia/reperfusion-induced CHOP expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: the role of acidosis and GPR4. *PLoS ONE* 9(10):e110944
- Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Okamura M, Huang T et al (2009) Suppression of NF- κ B by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J Immunol* 182(11):7201–7211
- El-Achkar TM, Huang X, Plotkin Z, Sandoval RM, Rhodes GJ, Dagher PC (2006) Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll-like receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(5):F1034–F1043
- Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Scwab GM, Peng B, Uwagawa T et al (2004) NF- κ B and AP-1 connection: mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 24(17):7806–7819
- Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Roach JC et al (2006) Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 441(7090):173–178
- Gluba A, Banach M, Hannam S, Mikhailidis DP, Sakowicz A, Rysz J (2010) The role of Toll-like receptors in renal diseases. *Nat Rev Nephrol* 6(4):224–235
- González-Guerrero C, Ocaña-Salceda C, Berzal S, Carrasco S, Fernández-Fernández B, Cannata-Ortiz P et al (2013) Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF- κ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 272(3):825–841
- Grivennikov SI, Karin M (2010) Dangerous liaisons: sTAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(1):11–19
- Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA et al (1988) Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* 107(4):1359–1368
- Issa N, Kukla A, Ibrahim HN (2013) Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am J Nephrol* 37(6):602–612
- Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J, Ortiz A (2003) Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 14(12):3072–3080
- Justo P, Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Winkles JA, Lorz C, Egido J et al (2006) Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int* 70(10):1750–1758
- Kanellis J, Ma FY, Kandane-Rathnayake R, Dowling JP, Polkinghorne KR, Bennett BL et al (2010) JNK signalling in human and experimental renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant* 25(9):2898–2908
- Kitching AR, Holdsworth SR (2011) The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol* 22(2):235–238
- Koike K, Ueda S, Yamagishi S, Yasukawa H, Kaida Y, Yokoro M et al (2014) Protective role of JAK/STAT signaling against renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *Clin Immunol* 150(1):78–87
- Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS et al (2011) Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol* 22(2):317–326
- Lee JJ, Kim DH, Kim DG, Lee HJ, Min W, Rhee MH et al (2013) Toll-like receptor 4-linked Janus kinase 2 signaling contributes to internalization of *Brucella abortus* by macrophages. *Infect Immun* 81(7):2448–2458
- Li HF, Cheng CF, Liao WJ, Lin H, Yang RB (2010) ATF3-mediated epigenetic regulation protects against acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 21(6):1003–1013
- Lim BJ, Hong SW, Jeong HJ (2009) Renal tubular expression of Toll-like receptor 4 in cyclosporine nephrotoxicity. *APMIS* 117(8):583–591
- Lim SW, Li C, Ahn KO, Kim J, Moon IS, Ahn C, Lee JR, Yang CW (2005) Cyclosporine-Induced Renal Injury Induces Toll-like Receptor and Maturation of Dendritic cells. *Transplantation* 80(5):691–699
- Loiarro M, Ruggiero V, Sette C (2010) Targeting TLR/IL-1R signaling in human diseases. *Mediat Inflamm* 2010:674363
- Ma LJ, Fogo AB (2009) PAI-1 and kidney fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:2028–2041
- Martinon F, Chen X, Lee AH, Glimcher LH (2010) TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* 11(5):411–418
- Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY (2014) Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 10(9):493–503
- Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M (2009) Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 4(2):481–508
- Neria F, Castilla MA, Sanchez RF, Gonzalez Pacheco FR, Deudero JJ, Calabia O et al (2009) Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int* 75(2):227–234
- Noh MR, Kim JJ, Han SJ, Lee TJ, Park KM (2015) C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Biochim Biophys Acta* 1852(9):1895–1901
- Okugawa S, Ota Y, Kitazawa T, Nakayama K, Yanagimoto S, Tsukada K et al (2003) Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(2):C399–C408
- Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Fernandez-Vizcarra P, Mallavia B, Flores C et al (2010) Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 21(5):763–772

- O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM (2013) JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med* 368(2):161–170
- Ponticelli C (2005) Cyclosporine: from renal transplantation to autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 1051:551–558
- Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Sanz AB, Ramos AM, Eguchi S, Batlle D et al (2013) TWEAK transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates renal inflammation. *J Pathol* 231(4):480–494
- Sanchez-Niño MD, Poveda J, Sanz AB, Mezzano S, Carrasco S, Fernandez-Fernandez B et al (2013) Fn14 in podocytes and proteinuric kidney disease. *Biochim Biophys Acta* 1832(12):2232–2243
- Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niño MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kretzler M et al (2008) The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 19(4):695–703
- Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM et al (2009) Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J Cell Mol Med* 13(9B):3329–3342
- Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M et al (2010) NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 21(8):1254–1262
- Sawinski D, Trofe-Clark J, Leas B, Uhl S, Tuteja S, Kaczmarek JL et al (2016) Calcineurin inhibitor minimization, conversion, withdrawal, and avoidance strategies in renal transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant* 16(7):2117–2138
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehemann K, Wesselborg S (1997) Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology* 198(1–3):35–49
- Ucero AC, Benito-Martin A, Fuentes-Calvo I, Santamaria B, Blanco J, Lopez-Novoa JM et al (2013a) TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes kidney fibrosis and Ras-dependent proliferation of cultured renal fibroblast. *Biochim Biophys Acta* 1832(10):1744–1755
- Ucero AC, Berzal S, Ocaña-Salceda C, Sancho M, Orzáez M, Messeguer A et al (2013b) A polymeric nanomedicine diminishes inflammatory events in renal tubular cells. *PLoS ONE* 8(1):e51992
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP et al (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287(5453):664–666
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J et al (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285(5425):248–251
- Wang S, Schmaderer C, Kiss E, Schmidt C, Bonrouhi M, Porubsky S et al (2010a) Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling. *Dis Model Mech* 3(1–2):92–103
- Wang S, Yang N, Zhang L, Huang B, Tan H, Liang Y et al (2010b) (2007) Jak/STAT signaling is involved in the inflammatory infiltration of the kidneys in MRL/lpr mice. *Lupus* 19(10):1171–1180
- WHO (2015) Annex 1 19th WHO model list of essential medicines (April 2015). http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf. Accessed 17 June 2016
- Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM et al (2007) TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 117(10):2847–2859
- Wu H, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U, Wyburn KR, Chadban SJ (2010) HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 21(11):1878–1890
- Whitmore MM, Iparraguirre A, Kubelka L, Weninger W, Hai T, Williams BR (2007) Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3. *J Immunol* 179(6):3622–3630
- Zafrani L, Ince C (2015) Microcirculation in acute and chronic kidney diseases. *Am J Kidney Dis* 66(6):1083–1094
- Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, Akira S, Reeves WB (2008) TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 19(5):923–932
- Zhang X, Dong H, Zhang S, Lu S, Sun J, Qian Y (2015) Enhancement of LPS-induced microglial inflammation response via TLR4 under high glucose conditions. *Cell Physiol Biochem* 35(4):1571–1581
- Zhou TB (2014) Role of high mobility group box 1 and its signaling pathways in renal diseases. *J Recept Signal Transduct Res* 34(5):348–350
- Zhu X, Zhang J, Sun H, Jiang C, Dong Y, Shan Q et al (2014) Ubiquitination of inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) by the E3 ligase CHIP mediates the IRE1/TRAF2/JNK pathway. *J Biol Chem* 289(44):30567–30577

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus induce vascular inflammation and endothelial activation through TLR4 signaling

Raquel Rodríguez-Díez¹, Cristian González-Guerrero^{1,*}, Carlos Ocaña-Salceda^{1,*}, Raúl R. Rodríguez-Díez¹, Jesús Egido^{1,3}, Alberto Ortiz^{1,3}, Marta Ruiz-Ortega² & Adrián M. Ramos¹

Received: 09 March 2016

Accepted: 26 May 2016

Published: 13 June 2016

The introduction of the calcineurin inhibitors (CNIs) cyclosporine and tacrolimus greatly reduced the rate of allograft rejection, although their chronic use is marred by a range of side effects, among them vascular toxicity. In transplant patients, it is proved that innate immunity promotes vascular injury triggered by ischemia-reperfusion damage, atherosclerosis and hypertension. We hypothesized that activation of the innate immunity and inflammation may contribute to CNI toxicity, therefore we investigated whether TLR4 mediates toxic responses of CNIs in the vasculature. Cyclosporine and tacrolimus increased the production of proinflammatory cytokines and endothelial activation markers in cultured murine endothelial and vascular smooth muscle cells as well as in *ex vivo* cultures of murine aortas. CNI-induced proinflammatory events were prevented by pharmacological inhibition of TLR4. Moreover, CNIs were unable to induce inflammation and endothelial activation in aortas from TLR4^{-/-} mice. CNI-induced cytokine and adhesion molecules synthesis in endothelial cells occurred even in the absence of calcineurin, although its expression was required for maximal effect through upregulation of TLR4 signaling. CNI-induced TLR4 activity increased O₂⁻/ROS production and NF-κB-regulated synthesis of proinflammatory factors in cultured as well as aortic endothelial and VSMCs. These data provide new insight into the mechanisms associated with CNI vascular inflammation.

Chronic allograft vasculopathy is a pathological condition that impairs endothelial function and integrity and negatively impacts on the half-life of both solid organ engrafted and patients. Among many other causes that contribute to chronic allograft vasculopathy, such as immune rejection, ischemic damage, hypertension and atherosclerosis, it is widely known that therapies based on the use of the calcineurin inhibitors (CNIs) cyclosporine A (CsA) and tacrolimus are main contributors in the development of this transplant-associated complication^{1–4}.

Endothelial damage and dysfunction that results in systemic hypertension are among the most recognized vascular affections in solid organ transplantation patients on CNIs. Mechanistically, apoptosis, oxidative stress and the inhibition of endothelium-derived NO production may contribute to CNI-induced endothelial cell damage and dysfunction^{5–7}. Moreover, there are evidences that vascular toxicity of CNIs also implicates vascular smooth muscle cells (VSMCs)⁸. Moreover, higher expression levels of TGFβ-1 receptor in endothelial cells caused renal arteriolar hyalinosis, which is associated to kidney dysfunction and glomerulosclerosis⁹. Even though CNIs potentially reduce the activation of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) in T cells, we have demonstrated the opposite effect in renal tubular cells¹⁰. Nonetheless, whether a similar NF-κB activation leading to inflammation can occur in vascular cells exposed to CNIs has not been addressed yet.

Activation of the innate immune system resulting in inflammation is an adaptive response aiming at eliminating invading microorganisms or re-establishing normal tissue functions after damage¹¹. However, sustained stimulation of the innate immunity may lead to inflammatory diseases. Toll-like receptors (TLRs) are key sensors

¹Laboratory of Nephrology and Vascular Pathology, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Madrid, Spain. ²Cellular Biology in Renal Diseases Laboratory, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Madrid, Spain. ³Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Madrid, Spain. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.M.R. (email: amramos@fjd.es)

of the innate immune system which are widely distributed in immune cells as well as in other cell types, including endothelial and VSMCs. Activation of TLRs results from binding to microbial toxins or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and to intracellular ligands or damaged-associated molecular patterns (DAMPs) released from stressed tissues. Signaling through TLR4 requires engagement of the cytoplasmic adaptor molecules Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein inducing interferon- β (IFN β) (TRIF). Main downstream targets of MyD88 and TRIF-adapted signaling are the NF- κ B pathway, the MAPK cascades and the interferon pathway which is exclusively regulated from TRIF-derived signals¹². A common end outcome in cell expressing TLR4 is the synthesis of many proinflammatory molecules, namely cytokines, chemokines and soluble mediators of inflammation¹³. On the other hand, TLR signaling must be restrained to avoid damaging and improper inflammatory responses through a battery of soluble decoy TLRs and intracellular negative regulators for TLR4-derived signaling pathways¹⁴. TLR4 expressed on endothelial and VSMCs has been proposed to contribute to vascular inflammatory responses^{15,16}. TLR4 is also required for triggering early vascular events accessory to inflammation, such as endothelial activation during ischemic damage in acute kidney injury and allogeneic kidney transplantation^{18,19}. Moreover, recent investigations have highlighted a role of TLR4 in experimental vascular injury by mediating not only inflammation but also dysfunction, remodelling and stiffness associated with spontaneous or induced hypertension in rats²⁰. These data pointed to a role of TLR4 activation in vascular damage and dysfunction. Nonetheless, the involvement of TLR4 as mediator of CNI-induced vascular injury has not been studied to date. We show in this study that in relevant vascular cell types and in aortic tissue, CNIs induce vascular inflammation through a previously non described mechanism involving TLR4 activation.

Material and Methods

Cells and reagents. The murine MS1 (Mile Sven 1) pancreatic islet endothelial cell line, obtained from American Type Culture Collection (ATCC[®], CRL-2279TM), is a commonly used model of microvascular endothelium. MS1 cells were cultured in high glucose (4.5 g/l) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 5% de complemented (heat inactivated) fetal bovine serum (FBS), 120 U/ml streptomycin/penicillin and 4 mM L-Glutamine, in 5% CO₂ at 37 °C. MOVAS (ATCC[®], CRL-2797TM) is an established VSMC line from C57BL/6 mice. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-Glutamine and 0.2 mg/ml G-418 (all reagents obtained from Lonza). For experiments, cells at 80% confluence were growth-arrested by serum starvation for 24 h. Endotoxin-free CsA (Calbiochem, Merck Chemicals) and tacrolimus (US Biological) stock solutions (10 mg/ml) were dissolved in ethanol. CLI-095 (InvivoGen) was used according to manufacturer's time and dose recommendations. The NF- κ B inhibitor parthenolide, the TRIF inhibitor resveratrol and the antioxidants 4'-hydroxy-3'-methoxyacetophenone (apocynin) and diphenyleneiodonium chloride (DPI) were from Sigma-Aldrich. These reagents were used at concentration derived from prior dose-response studies in our laboratory or from bibliographic data.

Gene expression studies. One μ g RNA isolated by Tripure (Roche) was reverse transcribed with High Capacity cDNA Archive Kit and real-time PCR was performed on a ABI Prism 7500 PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) using the DeltaDelta Ct method. RT-PCR was performed using the following fluorogenic (FAM or VIC) predesigned primers (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific): Ccl2/MCP1 (Mm00441242_m1), Ccl5/RANTES (Mm01302428_m1), Il6 (Mm00446190_m1), Tnfa (Mm00443258_m1), Icam1 (Mm00516023_m1), Vcam1 (Mm01320970_m1), Sele (Mm01310197_m1), Et1 (Mm00438656_m1), Inf1b1 (Mm00439552_s1), IRF1 (Mm01288580_m1), IRF7 (Mm00516793_m1). Results were expressed in copy numbers, calculated relative to unstimulated cells or aortas, after normalization against GAPDH using the ABI Prism 7500 Fast sequence detection PCR system software (Applied Biosystems).

ELISA. Cells were stimulated with CsA (10 μ g/ml) or tacrolimus (20 μ g/ml) and murine MCP-1 and VCAM-1 were determined in the supernatants by ELISA according to manufacturer's recommendations (BD).

Gene silencing. Gene silencing by RNA interference in cultured cells was performed using predesigned small interfering RNA (siRNA) corresponding to MyD88 (#S201719), calcineurin (#S72075) or a scrambled siRNAs (#4390843) (Ambion, Thermo Fisher Scientific). Subconfluent cells were overnight transfected with 25 nM (MyD88), 100 nM (calcineurin) siRNA or with the scrambled siRNA used at the same concentration as the specific siRNA, employing 50 nM Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) or treated only with lipofectamine vehicle, according to the manufacturer's instructions. Then, cells were incubated with 10% heat-inactivated (FBS) for 24 h, followed by 24 h in serum-free medium before the experiments.

Western blot. Protein content from cell extracts homogenized in lysis buffer (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 0.1 mmol/L PMSF, 25 mmol/L NaF) was determined by the bicinchoninic acid method (Pierce Biotechnology). Proteins were separated by 10% SDS-PAGE under reducing conditions and then blotted onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% skim milk in TBS-T (0.05 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4). Thereafter, membranes were overnight probed at 4 °C with specific primary antibodies in the same blocking solution or 5% BSA in TBS-T and then incubated with secondary HRP-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. Primary antibodies used were: MyD88 (#4283), phospho-I κ B α (#2859) and phospho-p65 (Ser536) (#3033) from Cell Signaling Technology; calcineurin (panA) (#07-1491) from Merck Millipore and phospho-IRF3 (pSer936) (#SAB4504031) from Sigma-Aldrich. Antibodies to α -Tubulin (Sigma-Aldrich) and mouse polyclonal anti-GAPDH (Merck-Millipore) were used to correct minor differences in protein loading.

Immunofluorescence. MS1 cells seeded in 24-well culture plates over glass coverslips. Then, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS, permeabilized in 0.1% Triton X-100/BSA 2%/PBS for 5 minutes, washed with PBS and then blocked with 2% BSA/PBS for 1 h. Then, cells were incubated with rabbit polyclonal anti-RelA/p65 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology #sc-372) followed by AlexaFluorTM488 conjugated anti-rabbit antibody (1:500, Invitrogen) and nuclei counterstained with DAPI.

Tissue immunofluorescence was carried out in 5 μ m thick Tissue Tek OCT-embedded (Sakura Finetek Europe BV) aorta sections. Slides were rehydrated with 2% BSA in PBS during 1 h. After a blocking step, tissue sections were overnight incubated with the following primaries antibodies: anti NF- κ B/p65 (1:50) (Santa Cruz Biotechnology #sc-372), anti CD31 (1:50) (Santa Cruz Biotechnology #sc-1506) and anti α SMA-FITC (1:300) (Sigma-Aldrich #F3777). Tissue incubation with p65 plus CD31 or α SMA antibodies was simultaneously carried out. After primary antibody step, tissue samples were incubated with the following secondary antibodies: AlexaFluorTM568 conjugated goat anti-rabbit antibody for detection of p65 in endothelial cells (1:250, Invitrogen), AlexaFluorTM647 conjugated goat anti-rabbit antibody for detection of p65 in VSMC (1:250, Invitrogen) and AlexaFluorTM488 donkey anti goat for CD31 (1:250, Invitrogen). Nuclei were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich).

In situ production of O₂⁻/ROS was evaluated through the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific). Briefly, OCT-embedded aortic section were equilibrated in KHS (30 min, 37°C) and incubated with DHE (5 μ M, 30 min, 37°C). DHE was detected by excitation at 540 nm and emission at 610 nm. The elastin layer was captured by autofluorescence (excitation at 488 nm). Both cells and tissue section were mounted in ProLong[®] Gold Antifade Reagent (Invitrogen) and analyzed with a TCS SP5 fluorescent laser scanning confocal microscope (Leica).

Tissue preparation. Studies were performed in 16–24 weeks old wild-type C57BL/6 mice (Charles River Laboratories) or in TLR4 knockout mice of the same background (kindly provided by Dr. Consuelo Guerri, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Spain and originally donated by Dr. S. Akira, Osaka University, Japan). Animals were maintained at the local animal facilities, with free access to food and water, normal light-dark cycles and under special pathogen-free conditions. Mice were sacrificed under anesthesia with Isoflurane (Abbott Laboratories) and aortas were dissected free of fat and connective tissue. Then, tissue sections were placed in culture plates, covered with DMEM medium and left untreated overnight at 37°C to recover the basal state. Next, aortic segments were stimulated with CsA or tacrolimus alone or in the presence of CLI-095, and then processed according to the procedure of interest. For assessment of O₂⁻/ROS production and NF- κ B/p65 location by confocal microscopy, tissue samples were placed in cold Krebs-Henseleit solution (KHS in mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 11.1 glucose, and 0.01 Na₂EDTA) containing 30% sucrose for 20 min, then transferred to a cryomold containing a Tissue Tek OCT-embedding medium (Sakura Finetek Europe BV) and then frozen at -80°C. For gene expression studies, aorta segments were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. All the procedures on animals were performed according to the European Community and Animal Research Ethical Committee guidelines. The animal protocols were approved by the Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz Animal Research Ethical Committee (body authorized by the Dirección General de Medioambiente, Consejería de medioambiente y Ordenación del Territorio, Comunidad de Madrid, RD 53/2013).

Statistics. Statistical analysis was performed using SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL). Results are expressed as mean \pm SEM. Significance at the $p < 0.05$ level was assessed by non-parametric Mann-Whitney test for two independent samples.

Results

In murine endothelial cells, CNIs promote the synthesis of NF- κ B-dependent chemokines and adhesion proteins. Endothelia are highly exposed to the toxic action of circulating CNIs. To assess whether CNIs induce direct proinflammatory effects in endothelial cells, cultured murine endothelial cells were treated with CsA or tacrolimus under standard *in vitro* dose and time conditions^{10,21} and the mRNA and protein expression of key proinflammatory cytokines and adhesion molecules were assessed by PCR and ELISA assays, respectively. Treatment with CsA and tacrolimus caused a dose-dependent upregulation of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1/chemokine (C-C motif) ligand 2 (MCP1/CCL2) and regulated on activation normal T cell expressed and secreted/chemokine (C-C motif) ligand 5 (RANTES/CCL5) gene expression at 6 h (Fig. 1A). At the same time, CsA and tacrolimus also induced the mRNA synthesis of relevant vascular proinflammatory cytokines and endothelial activation markers, namely IL-6 and TNF- α , and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), respectively (Fig. 1B). Accordingly, when supernatants of cultured cells were analyzed by ELISA, a time-dependent accumulation of the corresponding CCL2 and ICAM-1 secreted proteins was also found (Fig. 1C,D).

Activation of NF- κ B is intrinsically involved in regulating the inflammatory response in the cardiovascular system^{22,23}. Nuclear translocation of NF- κ B/p65 subunit is a key event in NF- κ B activation. An increased nuclear NF- κ B/p65 content in cells treated with CsA or tacrolimus for 30 min, which is compatible with the upregulated synthesis of proinflammatory factors previously found, was observed by confocal immunofluorescence (Fig. 2A). Indeed, pretreatment of cells with the NF κ B inhibitor parthenolide²³, prevented the CNI-induced CCL2, CCL5, ICAM-1 and VCAM-1 expression (Fig. 2B). Taken together, these results are consistent with a role of NF- κ B regulating the CNI-induced proinflammatory events in endothelial cells.

Toll-like receptor signaling is a key event mediating CNI-induced proinflammatory activity in endothelial cells. The vasculature may react against injury by activating TLRs, which are key innate immunity

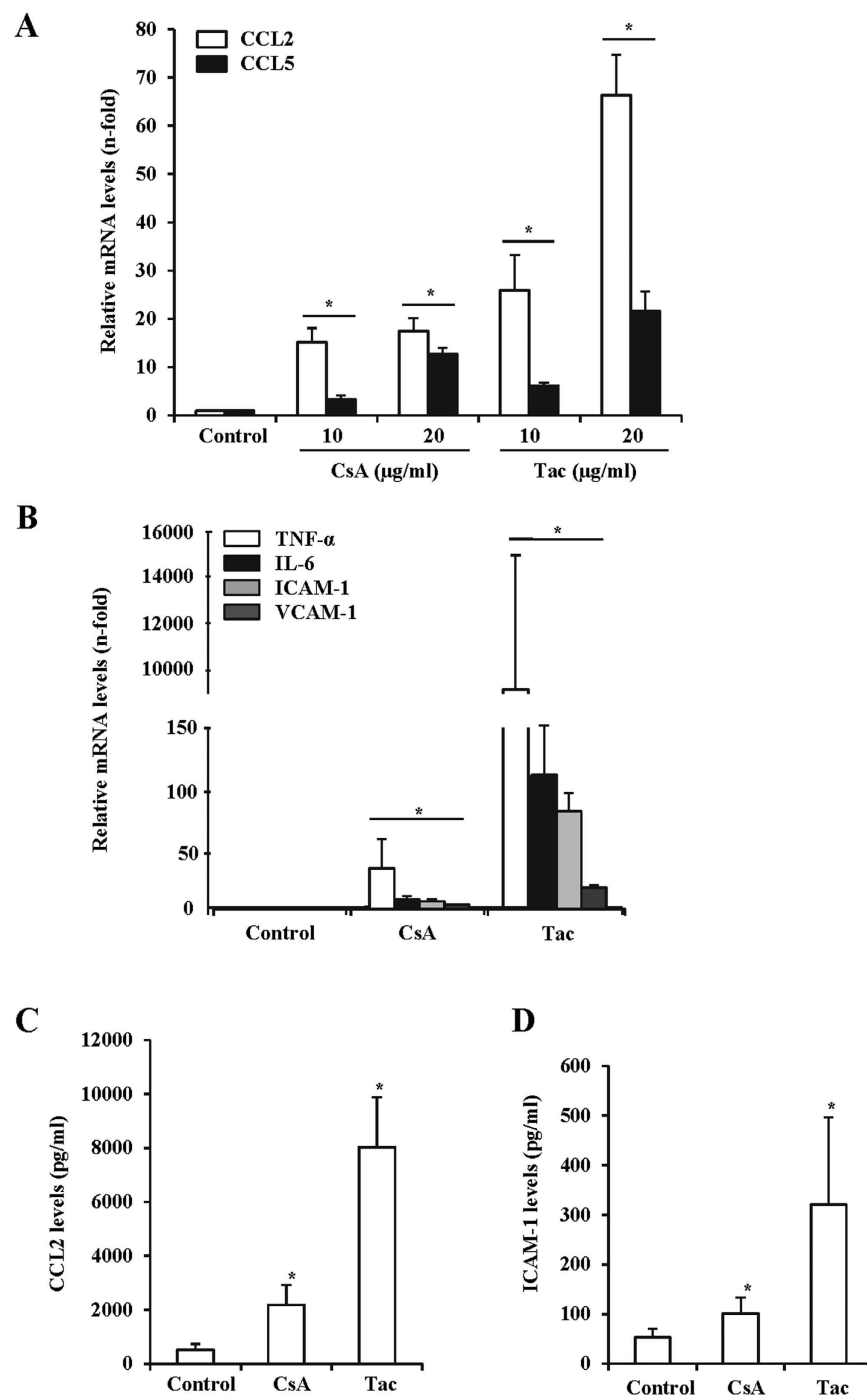


Figure 1. CNIs induce the expression of inflammatory mediators and endothelial activation markers in murine endothelial cells. The expression of proinflammatory cytokines and endothelial activation markers was evaluated in murine endothelial cells exposed to cyclosporine (CsA) or tacrolimus (Tac). **(A)** Dose-dependent CCL2 and CCL5 mRNA expression in cells treated for 6 h with 10–20 μg/ml CsA or Tac, assessed by qRT-PCR. **(B)** TNF-α, IL-6, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA expression in cells treated with 10 μg/ml CsA and 20 μg/ml Tac, qRT-PCR. **(C,D)** CCL2 **(C)** or ICAM-1 **(D)** protein levels assessed by ELISA in supernatants from cells stimulated with 10 μg/ml CsA, 20 μg/ml Tac or vehicle (Control). Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs control.

sensors that promote endothelial activation and inflammation. Since lack of the adaptor protein MyD88 precludes TLR-derived signaling leading to NF-κB activation, we studied the role of TLRs in CNI-induced proinflammatory events by gene silencing of MyD88 expression in endothelial cells. Knockdown of MyD88 was successfully achieved in cells transfected with a specific MyD88-siRNA as judged by the very low protein expression compared to cells

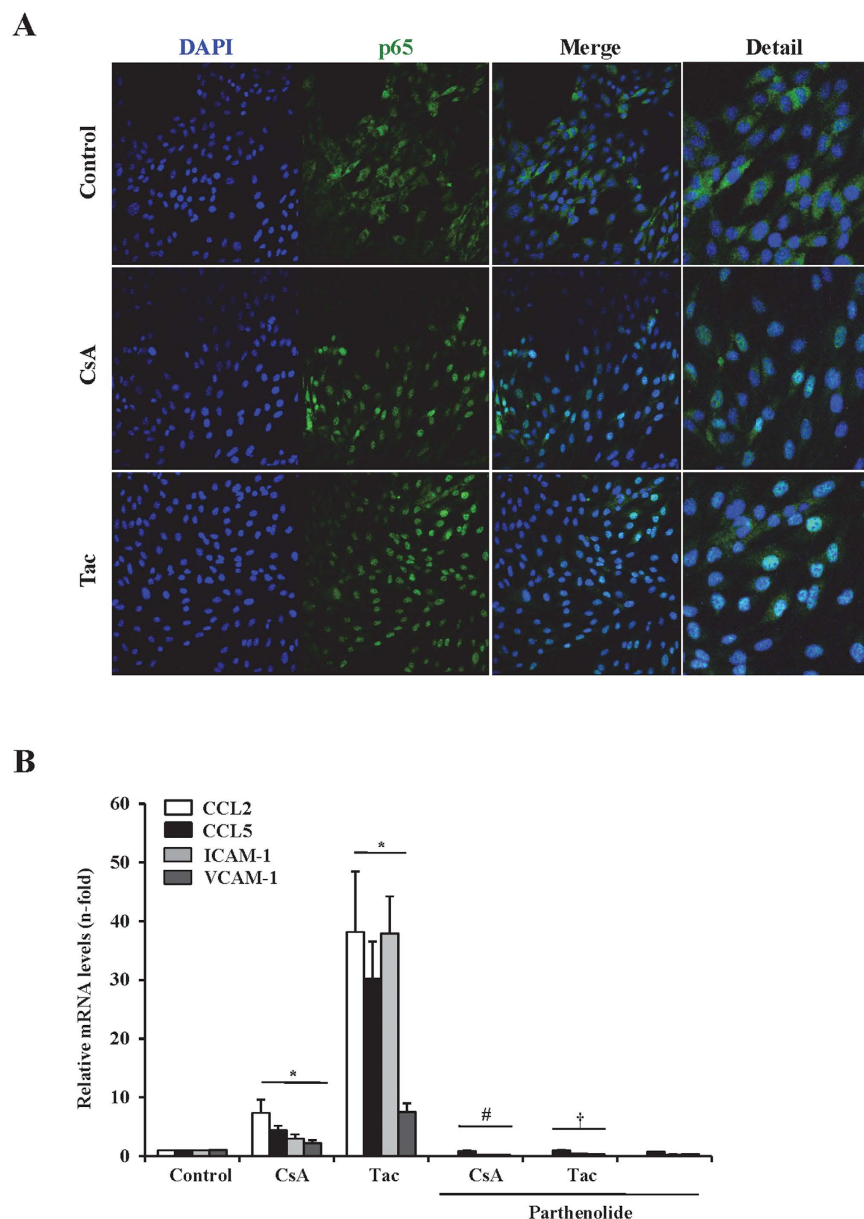


Figure 2. Proinflammatory responses elicited by CNIs in endothelial cells depend on NF- κ B activation. (A) Representative confocal microscopy immunofluorescence images showing NF- κ B/p65 (green) nuclear translocation in cells stimulated for 30 min with 10 μ g/ml CsA and 20 μ g/ml Tac. Nuclei were counterstained with or without 4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI) (blue). Original magnification $\times 400$. (B) Addition of the NF- κ B inhibitor parthenolide 1 h before stimuli, abolished the CsA or Tac-induced CCL2, CCL5, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA upregulation at 6 h. Mean \pm SEM of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs control; # $p \leq 0.05$ vs CsA, $^{\dagger}p \leq 0.05$ vs Tac.

transfected with a scramble siRNA (Fig. 3A). In addition, functional assays showed that MyD88 silencing prevented the CCL2 and ICAM-1 synthesis induced by LPS, a known agonist of the TLR/MyD88 pathway (Fig. 3B,C). Significantly, MyD88 knockdown also decreased CNI-induced CCL2 and ICAM-1 protein synthesis, as assessed by ELISA in culture supernatants (Fig. 3B,C). Moreover, taking tacrolimus as representative CNI, MyD88 deficiency resulted in the inhibition of key events leading to NF- κ B pathway activation, namely I κ B α and p65 phosphorylation (Fig. 3D). These results support the conclusion that engagement of TLR is an initial event that promotes NF- κ B activation and hence the synthesis of proinflammatory genes in endothelial cells exposed to CsA or tacrolimus.

TLR4 is a specific target of CNIs in endothelial cells. Based on results obtained in endothelial cells with silenced MyD88, we searched for specific TLRs that could mediate the proinflammatory effects of CNIs. We focused on TLR4 because of its inherent relevance in vascular disease²⁴. Pharmacological inhibition of TLR4 with CLI-095, which specifically blocks signaling from the TLR4 intracellular domain, thoroughly repressed CsA- and tacrolimus-induced NF- κ B/p65 nuclear translocation (Fig. 4A) and gene expression of inflammatory cytokines

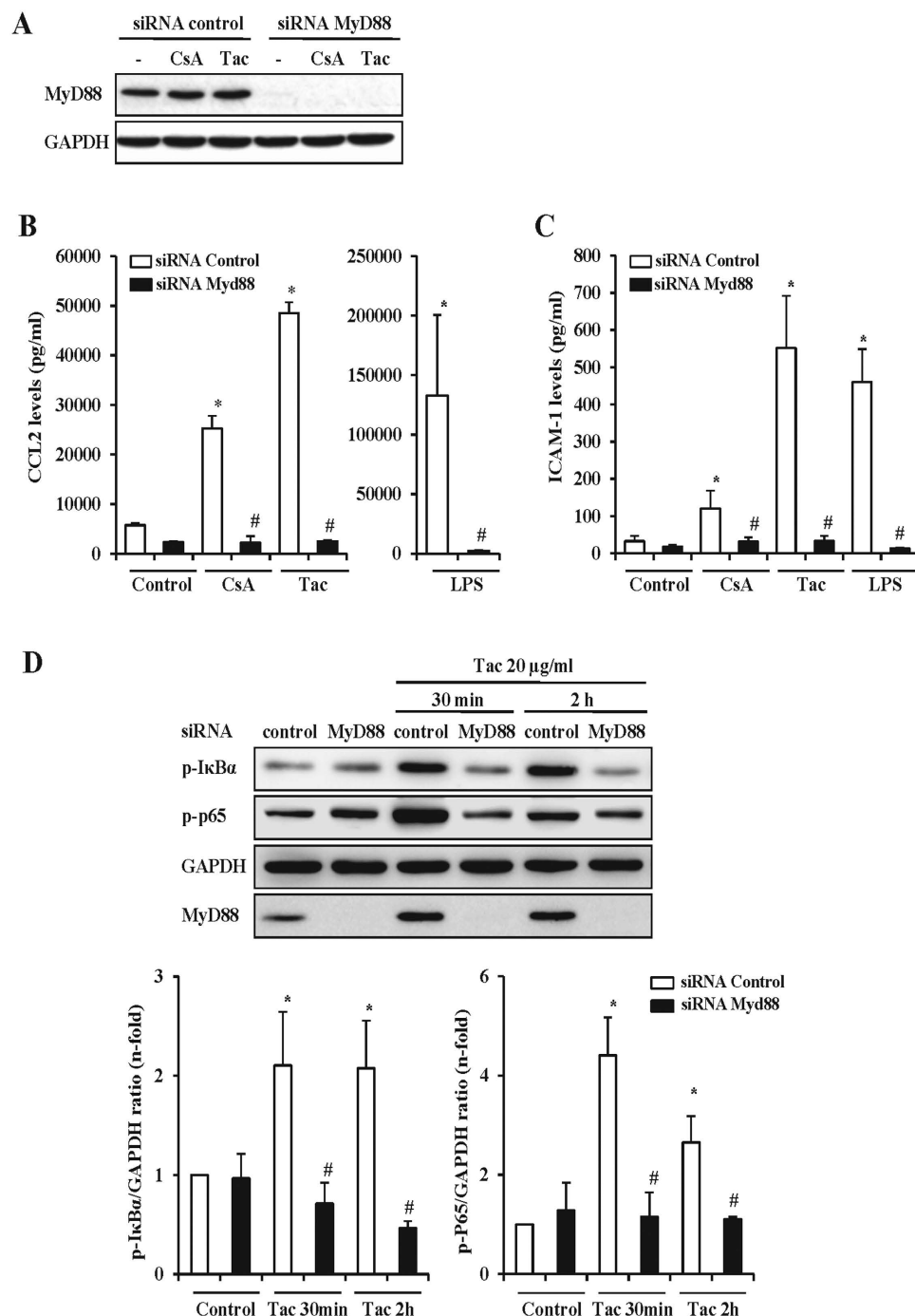


Figure 3. CNI-induced proinflammatory responses in endothelial cells depend on MyD88 signaling. (A) The overall efficiency of the transfection procedure was assessed by detection of MyD88 expression by western blot in total protein extracts from cells transfected with a scramble siRNA (sc-siRNA) or with a MyD88 siRNA (MyD88-siRNA). After transfection, cells were stimulated with vehicle, CsA or Tac for 24 h. The figure is a representative experiment showing an almost undetectable expression of MyD88 in MyD88-siRNA transfected cells compared to expression levels in cells transfected with the sc-siRNA. CsA or Tac did not significantly change MyD88 expression. β -actin was used as protein loading control. (B,C) Secretion of CCL2 and ICAM-1 was evaluated by ELISA in supernatants from control cells or from sc-siRNA or MyD88-siRNA transfected cells stimulated with CsA, Tac or vehicle for 24 h. Functional efficiency of MyD88 silencing was assessed in cells stimulated for 24 h with 1 µg/ml LPS, used as a control. Bar graphs represent the Mean \pm SEM of a set of six independent experiments. (D) Activation of the MyD88-dependent NF- κ B pathway assessed by phosphorylated I κ B α (p-I κ B α) and RelA/p65 (p-p65) levels in total protein extracts from sc-siRNA or MyD88-siRNA MS1 transfected cells treated with 20 µg/ml Tac. Image shows representative western blots of p-I κ B α and p-p65 from sets of four independent experiments for each protein and the corresponding quantification bar graphs depict the mean \pm SEM. A control western blot showing the lack of MyD88 expression in this experiment is also showed at the figure bottom. GAPDH was used as protein loading control. * $p < 0.05$ vs control (siRNA control); # $p < 0.05$ vs CsA or Tac (siRNA-MyD88).

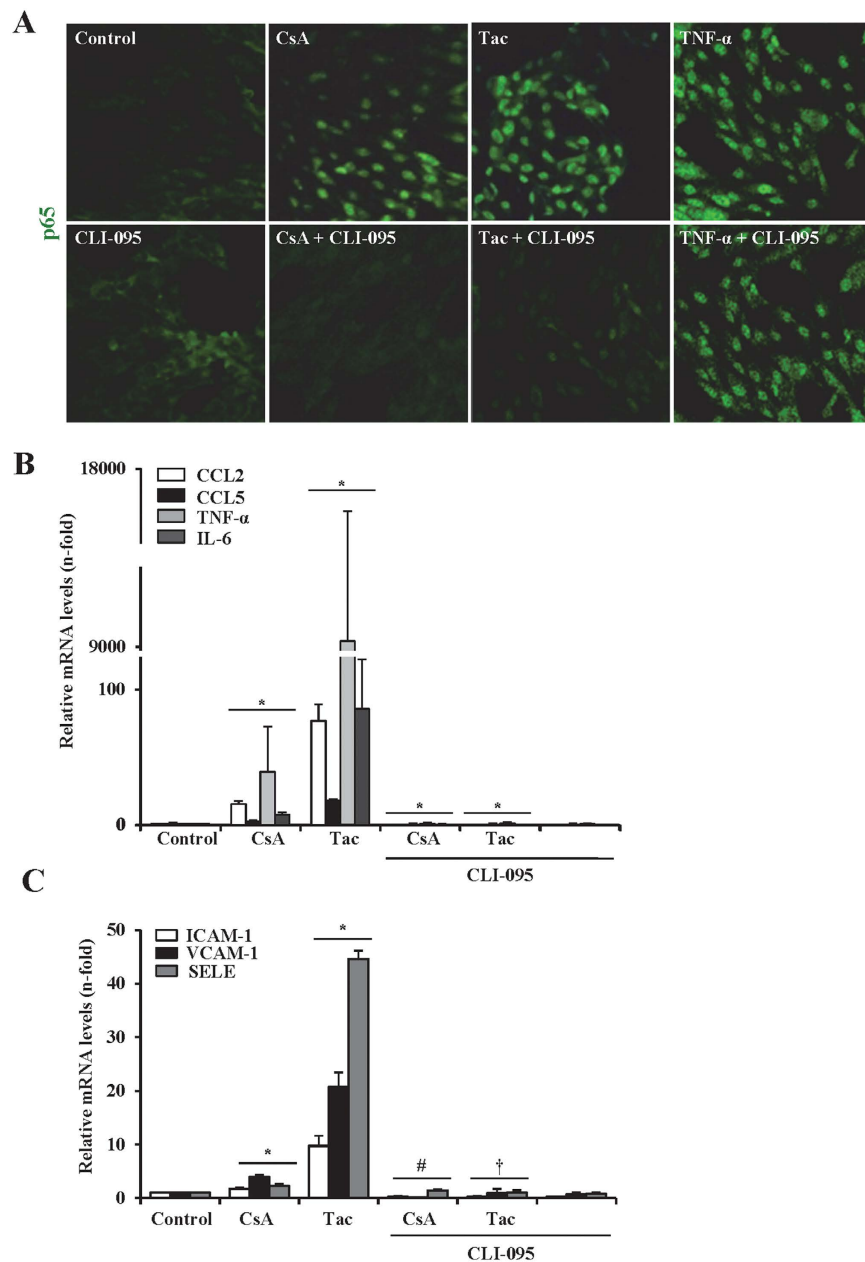


Figure 4. Pharmacological inhibition of TLR4 blocked proinflammatory responses induced by CsA and tacrolimus in endothelial cells. Cells were incubated with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml Tac alone or in the presence of the TLR4 inhibitor, CLI095 (added 6 h before the CNIs). **(A)** Activation of NF- κ B was assessed through the nuclear translocation of the NF- κ B/p65 subunit detected by immunofluorescence confocal microscopy. Control cells show a cytoplasmic NF- κ B/p65 staining (green) whereas in cells stimulated with CsA or Tac, NF- κ B/p65 was mostly located inside nuclei. By contrast, the TLR4 inhibitor CLI-095 prevented nuclear translocation of NF- κ B/p65. Cells were also stimulated with TNF- α (30 ng/ml) alone as a positive control of NF- κ B activation or preincubated with CLI-095 to prove that TLR4 inhibition does not interfere with TNF- α -mediated NF- κ B/p65 translocation. **(B,C)** Transcriptional levels of proinflammatory cytokines (CCL2, CCL5, TNF- α , IL-6) **(A)** and endothelial activation markers (ICAM-1, VCAM1, SELE) **(B)** were evaluated by qRT-PCR. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs control; # $p \leq 0.05$ and † $p \leq 0.05$ vs CsA or Tac, respectively.

represented by CCL2, CCL5, TNF- α and IL-6 (Fig. 4B) and adhesion molecules, including VCAM-1, ICAM-1 and SELE (Fig. 4C). These results indicate a key role of TLR4 promoting CNI-induced endothelial inflammation, since this response was almost completely inhibited by the receptor blockade.

The preceding results show that in endothelial cells, CNIs activate TLR4 to transduce input signals into MyD88-dependent proinflammatory effects. To study whether CNI also activate a MyD88-independent pathway, we tested for phosphorylation of the transcription factor IRF3, which is activated following TLR4/TRIF

engagement, in endothelial cells exposed to CsA or tacrolimus. Immunoblot assays disclosed a rapid increase of IRF3 phosphorylation from 15 minutes after addition of CsA or tacrolimus (Fig. 5A). Moreover, CsA and tacrolimus also activated the transcription of the IRF3 target $\text{INF}\beta 1$, and also of the $\text{INF}\beta 1$ -regulated proteins IRF1 and IRF7 (Fig. 5B). Thus, these results support the hypothesis that CNIs also trigger the MyD88-independent pathway by recruiting IRF3 at proximal TRIF-adapted TLR4 signaling complexes. Finally, we studied whether TRIF-dependent signaling influenced MyD88-dependent responses. To this end, before incubation with CNIs, endothelial cells were treated with Resveratrol to inhibit the assembly of TBK1 and RIP1 kinases in TLR4-TRIF complexes and hence avoid IRF3 activation²⁵. Resveratrol significantly reduced CCL2 gene expression, thus supporting that the TRIF-dependent TLR4 pathway also contributes to the overall CNI-dependent proinflammatory response triggered by TLR4 engagement in endothelial cells (Fig. 5C).

Calcineurin knockdown partially inhibits the activation of TLR4-dependent pathway elicited by CNIs in endothelial cells.

The role of calcineurin in CNI-induced proinflammatory endothelial events was specifically addressed by gene silencing of the α isoform of the catalytic subunit, thus preventing calcineurin activation and calcineurin stabilization by impeding the interaction of CNI-cyclophilin complexes with the regulatory calcineurin B subunit^{26,27}. In comparison with control cells transfected with the scramble siRNA, calcineurin expression was significantly reduced in endothelial cells transfected with a specific calcineurin siRNA (Fig. 6A). Calcineurin knockdown did not modify CCL2 and ICAM1 secretion by itself but partially inhibited the CNI-induced CCL2 and ICAM1 secretion into the cell culture media (Fig. 6B). To test whether TLR4 signaling modulation by calcineurin is a general mechanism, we stimulated the cells with the specific TLR4 ligand LPS. Accordingly, a quantitatively similar inhibition of CCL2 and ICAM1 production was observed in LPS-treated calcineurin silenced endothelial cells (Fig. 6B). Consistent with the partial reduction of CNI-induced CCL2 and ICAM1 secretion, calcineurin silencing barely downregulated $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ activation and furthermore, it did not modify p65 phosphorylation, an important event to enhance inflammatory gene transcription, in response to tacrolimus as representative CNI (Fig. 6C). However, activation of the TRIF-dependent pathway induced by CsA and tacrolimus, assessed by detection of phosphorylated IRF3 by western blot, was completely prevented by calcineurin deficiency (Fig. 6D). Overall, these results show that calcineurin absence can downregulate, at least in part, TLR4-derived proinflammatory signals evoked by the CNIs. Thus, normal calcineurin expression could heighten this response.

CNIs induce proinflammatory cytokine production and endothelial activation in isolated mice aortas and VSMCs.

CNIs alter vascular homeostasis by causing endothelial dysfunction, increased extracellular matrix deposition and hypertension. Subtle endothelial inflammation may contribute to these vascular wall pathogenic processes; however, a proinflammatory effect of CNIs on vascular tissue has not yet been explored. In *ex vivo* aorta cultures, CsA activated NF- κ B as indicated by the increased expression and nuclear translocation of the NF- κ B/p65 subunit in both endothelial cells (Fig. 7A) and VSMC (Fig. 7B). Similar behavior of p65 was also observed when aortas were treated with tacrolimus (data not shown). Likewise, CsA and tacrolimus also increased mRNA levels encoding NF- κ B-regulated proinflammatory cytokines involved in vascular injury, including CCL2, CCL5, IL-6 and TNF- α (Fig. 7C). Moreover, CsA and tacrolimus also increased the mRNA expression of the endothelial activation marker ICAM-1 and the vascular dysfunction marker endothelin-1 (ET-1) (Fig. 7D). To explore whether CNI-induced proinflammatory effects on vascular tissue require TLR4 activation, a pharmacological approach was used. Pretreatment of mice aortas with CLI-095 significantly prevented both NF- κ B activation (Fig. 7A,B) and hence the increased proinflammatory gene expression promoted by the CNIs (Fig. 7C,D). Interestingly, pharmacological TLR4 inhibition also prevented CNI upregulation of ET-1 mRNA expression, a key factor involved in the endothelial dysfunction (Fig. 7D). To reinforce these results, studies were done in aortas from TLR4^{-/-} mice. CsA or tacrolimus stimulation did not upregulate CCL2, IL6, ICAM-1 or ET-1 gene expression in isolated aortas from TLR4^{-/-} mice, thus confirming that TLR4 is a key intermediary of pathological vascular responses to CNI. Importantly, TLR4 deficient aortas were still responding to the inflammatory cytokine TNF- α , a not TLR4 ligand, as revealed by the increased CCL2, IL-6, ICAM-1 and ET-1 mRNA levels (Fig. 7E).

VSMCs play a central role in vascular inflammation and injury and may be a CNI target. Thus, we explored whether VSMCs contribute to the CNI-induced aortic inflammation. As in the case of endothelial cells and aorta, VSMCs increased CCL2, IL-6 and TNF- α mRNA levels in response to CNIs and this was prevented by TLR4 inhibition (Fig. 7F). This result suggests that activation of the TLR4 pathway by CNIs is highly conserved in the most relevant cell types of the vascular wall.

CNI-produced inflammation is linked to TLR4-dependent ROS production. Oxidative stress is a key mediator of inflammation in vascular disease so we explored whether CNIs increased reactive oxygen species (ROS) production in *ex vivo* cultured aortas exposed to CNIs alone or following exposure to CLI-095. Compared to untreated control aortas, those exposed to CsA showed an increased O_2^- /ROS production, mainly located to VSMCs but also detectable in endothelial cells (Fig. 8A). By contrast, pre-treatment with CLI-095 before CsA addition prevented ROS production as assessed by DHE staining, proving that TLR4 activation regulates O_2^- /ROS production (Fig. 8A). Similar results were obtained when aortas were incubated with tacrolimus (data not shown).

The precise contribution of TLR4-dependent O_2^- /ROS increases to CNI-induced vascular inflammation was further evaluated in endothelial cells chosen as model of CNI-induced TLR4 signaling. Similar to aorta experiments, pharmacological TLR4 inhibition also repressed O_2^- /ROS production as assessed by DHE staining (Fig. 8B). Further, the NADPH inhibitors apocinin and DPI prevented the upregulated CCL2, CCL5, VCAM-1 and ICAM-1 mRNA expression induced by CsA and tacrolimus (Fig. 8C). Altogether, these results point to oxidative stress and O_2^- /ROS production as a contributor to CNI-induced vascular inflammation and localized O_2^- /ROS formation downstream of TLR4 activation.

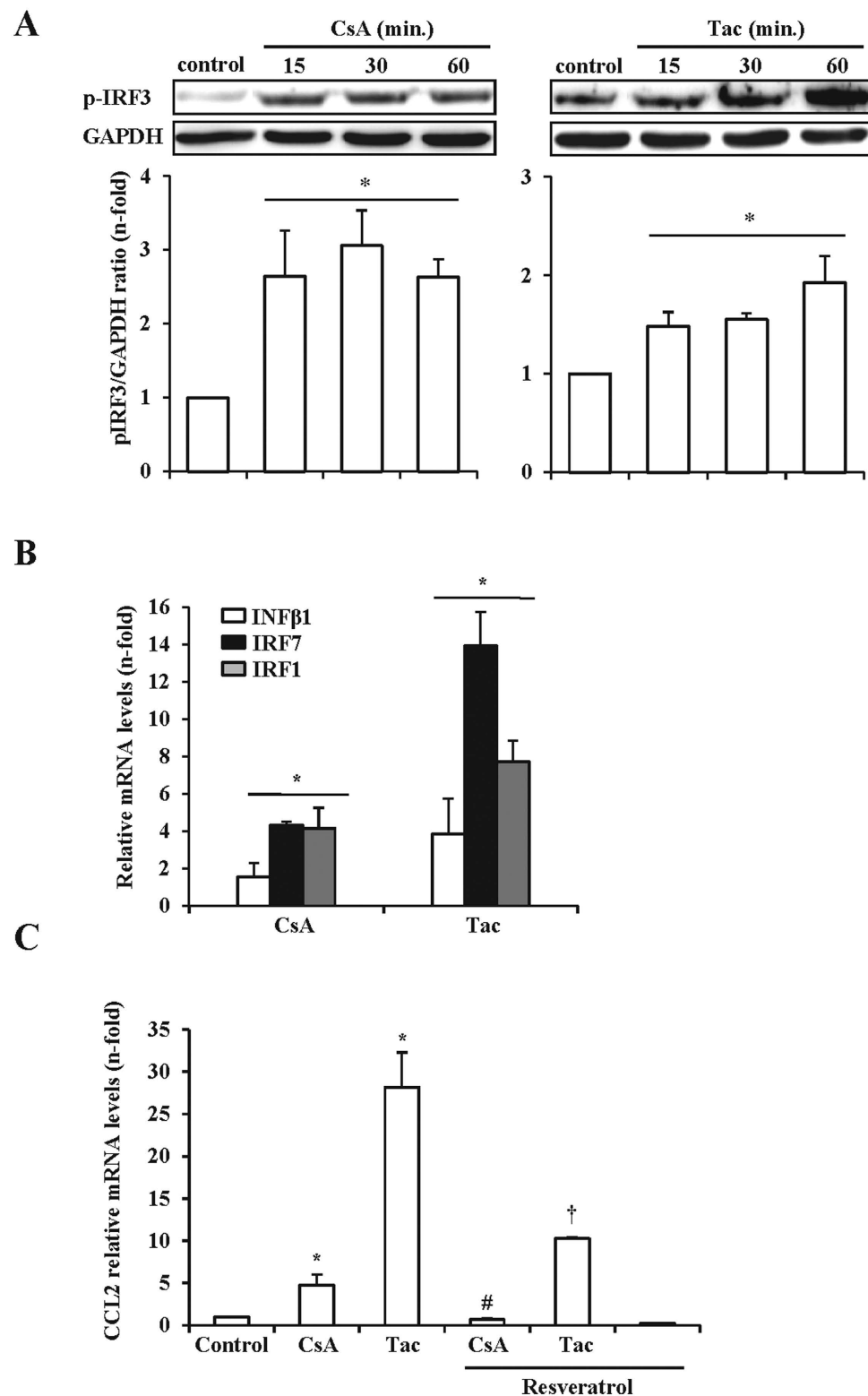


Figure 5. CsA and tacrolimus activate the TLR4/TRIF-dependent signaling pathway in endothelial cells. Cells were treated with CsA or Tac as in the preceding figures. (A) Representative western blots of the phosphorylated IRF3 (p-IRF3) using total protein extracts from cells treated with CsA or Tac for 15 to 60 min. Bar graphs represent the mean \pm SEM from three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs control. (B) Activity of the TRIF pathway was assessed by qRT-PCR quantification of IRF3 target gene (INFβ1, IRF7, IRF1) mRNA in cells stimulated with CsA or Tac for 6 h. Data expressed as mean \pm SEM of fold-change over control of at least three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs control. (C) TRIF pathway and proinflammatory response. Cells were stimulated with CsA or Tac for 6 h following pretreatment with 50 μ M resveratrol. CCL2 mRNA expression was assessed by qRT-PCR. Bar graph represents mean \pm SEM from three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs control; # $p \leq 0.05$ vs CsA, † $p \leq 0.05$ vs Tac.

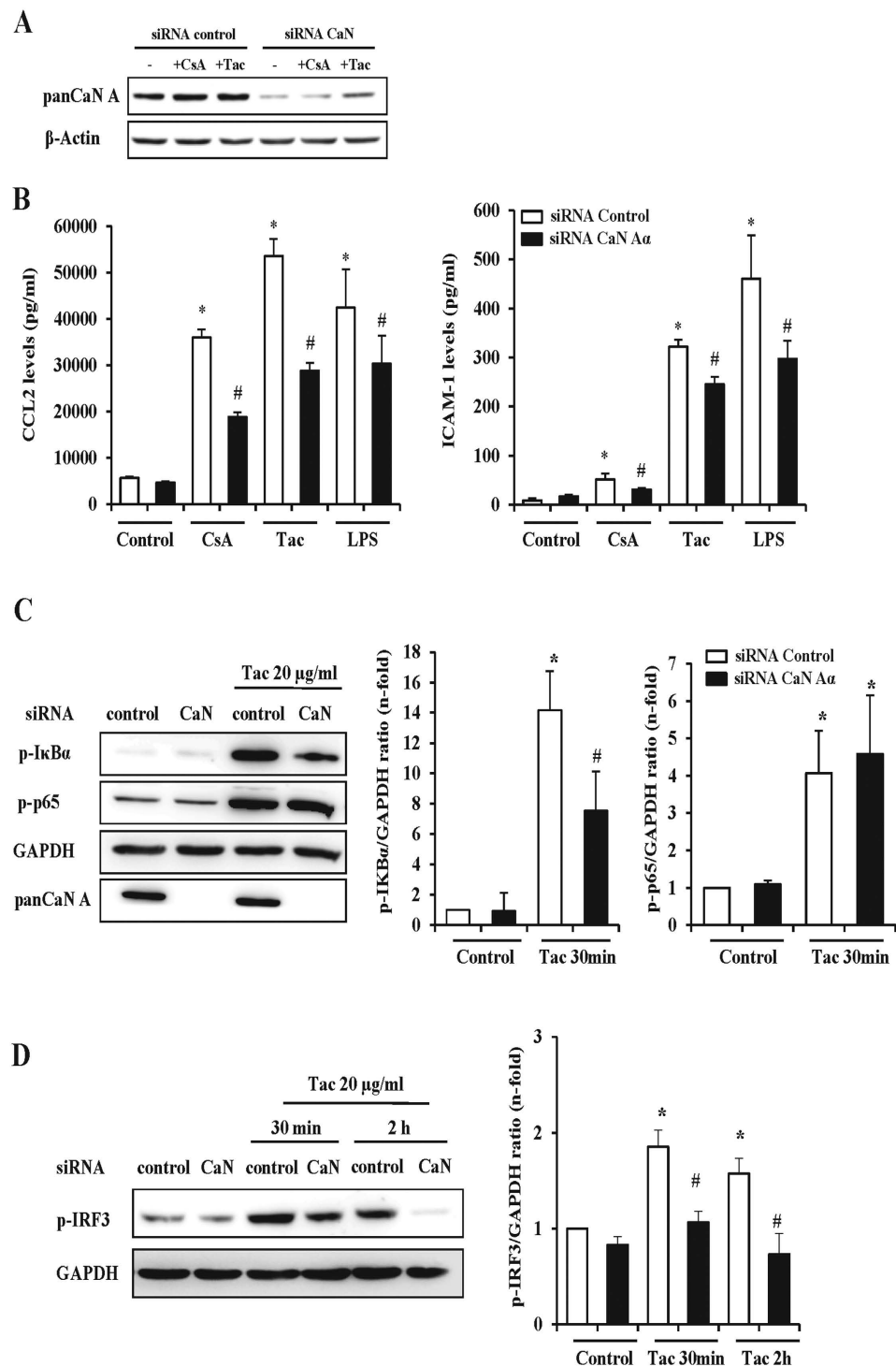


Figure 6. CNI proinflammatory activity in endothelial cells is partially dependent on calcineurin. Cells were transfected with a control scrambled siRNA (sc-RNA) or with a specific calcineurin siRNA (CaN-siRNA) and then stimulated with CsA or Tac to assess the efficiency of the silencing procedure (A), the magnitude of the overall proinflammatory response (B) or the activation of NF- κ B signaling (C). (A) Representative western blot showing calcineurin expression in control sc-siRNA or in CaN-siRNA cells stimulated with vehicle, CsA or Tac for 24 h. β -actin was used as protein loading control. (B) CCL2 and ICAM-1 ELISA in supernatants of sc-siRNA or CaN-siRNA transfected cells stimulated with CsA or Tac for 24 h. As positive control for TLR4 signaling cells were also stimulated with 1 μ g/ml LPS. Quantification graphs represent the mean \pm SEM of six independent experiments. * $p < 0.05$ vs sc-siRNA; # $p < 0.05$ vs Calcineurin-siRNA. (C) Comparative levels of calcineurin, phosphorylated I κ B α (p-I κ B α) and NF- κ B/p65 (p-p65) in control, sc-siRNA or in CaN-siRNA transfected cells stimulated with Tac for 24 h. Image shows representative western blots from three independent experiments and the corresponding quantification bar graph. * $p < 0.05$ vs control (siRNA control); # $p < 0.05$ vs CsA or Tac (siRNA-Calcineurin). GAPDH was used as protein loading control.

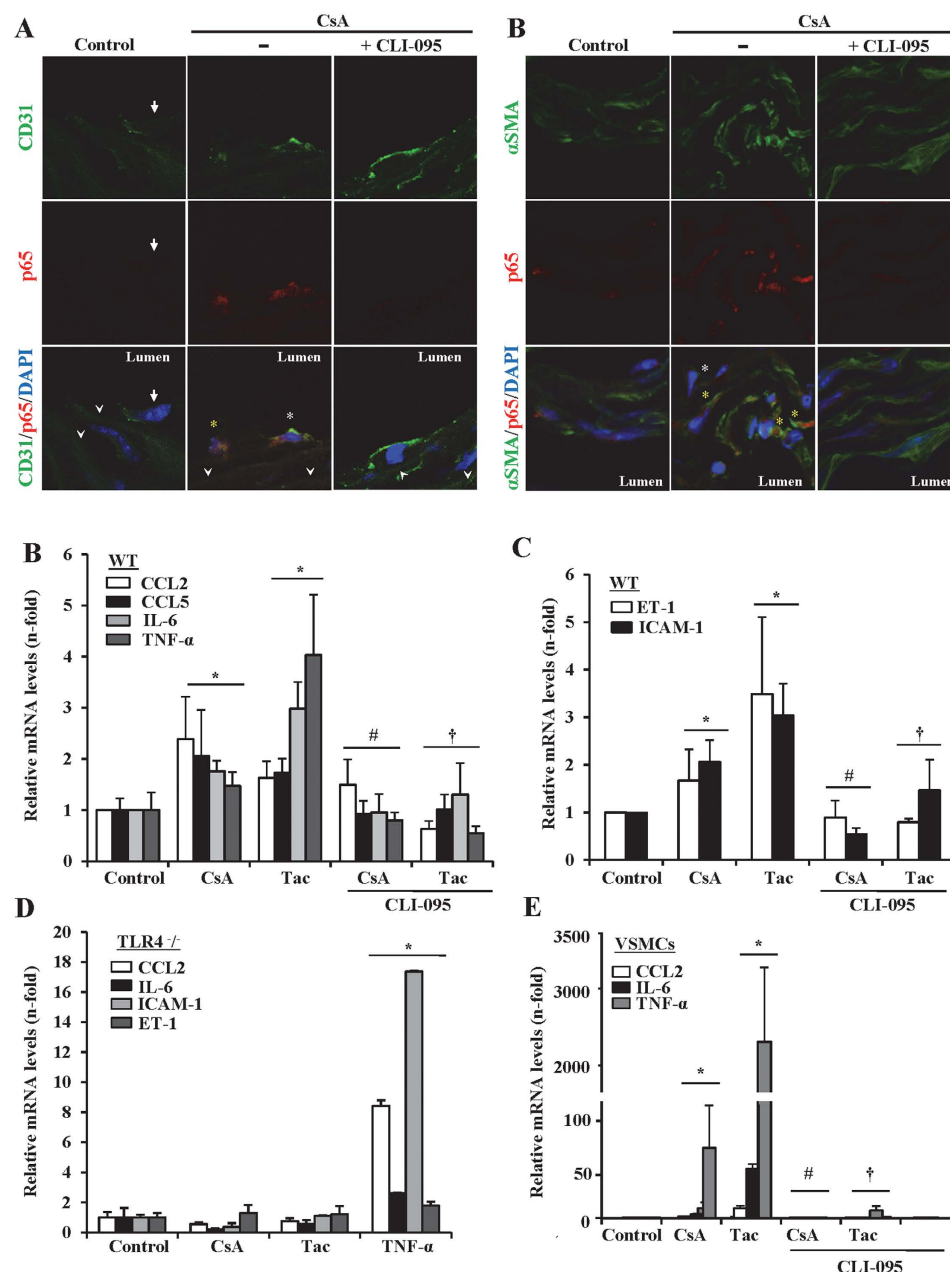


Figure 7. CNI induce inflammation in wild-type aortas but not in aortas from TLR4 $^{-/-}$ mice. Aorta tissue segments extracted from wild-type or TLR4 $^{-/-}$ C57BL/6 mice were stimulated for 6 h with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml Tac. CLI-095 was added 6 h before stimulation with the CNIs. (A,B) Confocal microphotographs showing NF- κ B/p65 content and location in control or CsA or CsA plus CLI-095 treated aortic sections from wild-type mice. Activation of NF- κ B/p65 was detected by intensification of the specific red fluorescence in cytoplasm and nucleus of either endothelial cells recognized by CD31 staining (green fluorescence surrounding the cell borders) (A) or VSMC cells expressing α SMA (cytoplasmic green fluorescence) (B). Endothelial cells were found lining the intima layer and facing the lumen and VSMC located in the media layer. Yellow asterisks point cells with nuclear translocation of p65 and white asterisks indicate cells with increased cytoplasmic p65 expression. White arrows point endothelial and VSMC without increased expression of p65 in control or CLI095 treated aortas. White arrowheads in A show elastin fibers (green autofluorescence) which otherwise are not apparently visualized in B because the much higher α SMA specific fluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI. Original magnification x630. (C,D) Gene expression of CCL2, CCL5, IL-6, TNF- α (left panel) and ICAM-1, ET-1 (right panel) in cultured aorta sections from wild-type mice exposed to CsA or Tac alone or in the presence of CLI-095. Data are expressed as mean \pm SEM of 4 samples. * p < 0.05 versus control non-stimulated aortas; # p < 0.05 vs CsA or Tac treated aortas. (E) Gene expression of CCL2, IL-6, ICAM-1 and ET-1 in cultured aorta sections from TLR4 $^{-/-}$ mice exposed to CsA, Tac or TNF- α . Data are the mean \pm SEM of 4 samples. * p < 0.05 versus control non-stimulated aortas. (F) CCL2, IL-6 and TNF- α mRNA expression in VSMC stimulated for 6 h with 10 μ g/ml CsA or 20 μ g/ml Tac alone or pretreated with vehicle or CLI-095. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * p \leq 0.05 vs control; # p \leq 0.05 and † p \leq 0.05 vs CsA or Tac alone, respectively.

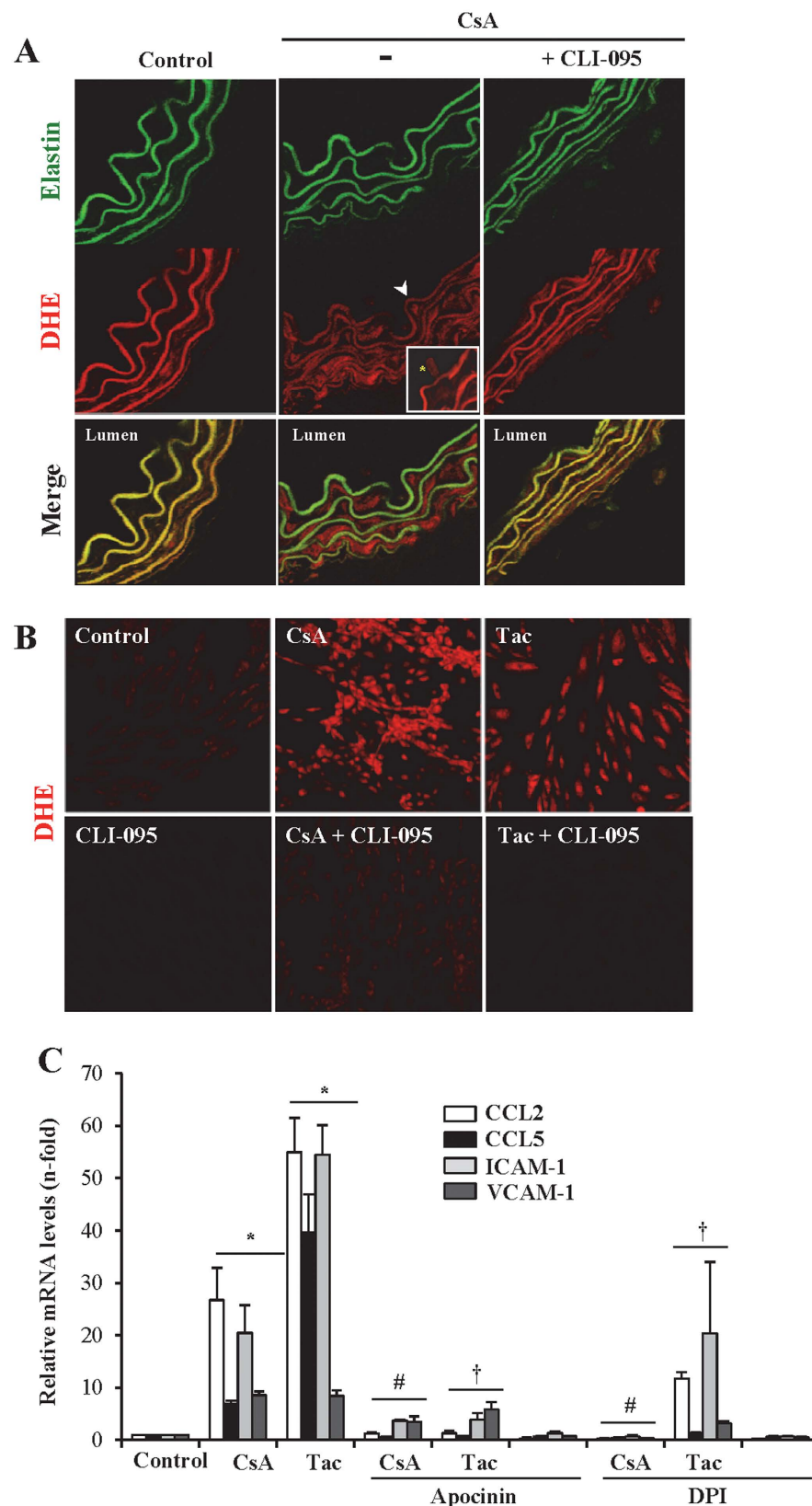


Figure 8. Activation of the TLR4 pathway by CsA and tacrolimus increases the production of O_2^- /ROS as inflammation mediator in aorta and endothelial cells. (A) Confocal photomicrographs of aortic tissue sections treated with $10\mu\text{g/ml}$ CsA for 6 h showing an increased O_2^- /ROS production measured as DHE staining (red fluorescence). Elastin autofluorescence (green) shows the structure of the artery that contrast with the red fluorescence indicating that O_2^- /ROS was mainly located in VSMCs (media layer) and also in endothelial cells (intima layer). White arrowhead shows DHE positive VSMCs and asterisk point DHE positive endothelial cells. (B) Confocal photomicrographs of endothelial cells treated with CsA, Tac, or CLI-095. (C) Bar graph showing relative mRNA levels of CCL2, CCL5, ICAM-1, and VCAM-1 in aortic tissue sections treated with CsA, Tac, or CLI-095, and the effect of Apocinin and DPI.

endothelial cells, which are showed at a larger augment (inset). Aortas subjected to pharmacological TLR4 inhibition with CLI-095 show a lesser DHE staining. Original magnification x630. **(B)** Representative confocal photomicrographs of O_2^- /ROS production measured as DHE positive staining in murine endothelial MS1 cells treated with 10 μ g/ml CsA (A) or 20 μ g/ml Tac for 6 h. Cells subjected to pretreatment with CLI-095 before CsA or Tac stimulation exhibit a basal DHE staining after treatment with CsA or Tac. **(D)** Gene expression of proinflammatory factors and adhesion molecules (CCL2, CCL5, VCAM-1 and ICAM-1) was assessed by PCR in MS1 cells treated with 10 μ g/ml CsA (A) or 20 μ g/ml Tac for 6 h, both in the presence or in the absence of the NADPH inhibitors Apocinin (10 mM) and DPI (10 μ M) added 1 h before the stimuli. The bar chart represent the Media \pm SEM of a set of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ vs control; # $p \leq 0.05$ and † $p \leq 0.05$ vs CsA or Tac alone, respectively.

Discussion

We have shown that CNIs modulate vascular behaviour by inducing proinflammatory events, namely endothelial activation as well as production of inflammatory cytokines, through TLR4 activation and ROS generation in endothelial cells and VSMC as well as in aortic tissue.

The role of the innate immunity and associated inflammatory mechanisms in the development of the vascular adverse effects of CNIs had not been specifically addressed previously. Vascular inflammation is a central process underlying endothelial dysfunction, vascular damage and progression of cardiovascular disease^{28,29}. Recent studies from our group disclosed that CNIs promote tubular inflammation in kidneys¹⁰. The present research demonstrated that CNIs also have proinflammatory effects on endothelial cells and VSMC, thus widening the spectrum of cell types susceptible to the inflammatory action of CNIs. A prior report explored the modulation by CsA of TNF- α /LPS-induced endothelial cell inflammation and observed that CsA promoted inflammation-induced monocyte adhesion to human intestinal endothelial cells but paradoxically, reduced inflammation-induced iNOS activation and adhesion molecule expression³⁰. Our results demonstrating that CNIs by themselves increased the expression of a complete spectrum of endothelial activation markers and inflammation mediators in cultured endothelial cells and murine aortas in a TLR4-dependent manner provide a better understanding of CNI-induced vascular injury and provide a knowledge frame to explain prior observations. Thus, direct induction of endothelial activation and cytokine production by CNIs may contribute to allograft vascular injury as well as to nephrotoxicity. While endothelial injury and inflammation negatively impact on normal VSMCs function, an inflammatory response from VSMC may also contribute to endothelial injury and dysfunction. Results obtained in isolated aortas and cultured VSMC point to a potential role of aorta-generated inflammatory cytokine, such as IL-6 and TNF- α , secreted in response to CNIs, in an autocrine or paracrine loop resulting in additional endothelial activation, cytokine production and worsening of the systemic vascular function^{13,29}.

NF- κ B is the major mediator of the inflammatory response in vascular cells and other cell types, and as such, it is an attractive target for chemoprevention of inflammatory diseases^{22,31}. NF- κ B expression correlates with upregulation of chemokines in human cardiovascular disease and in experimental models of vascular damage^{22,28,32–34}. We previously demonstrated that CNIs activate NF- κ B in renal tubular cells *in vitro* and in a mouse model of CsA nephrotoxicity¹⁰. In the present work, by means of pharmacological inhibition of I κ B kinase and I κ B α stabilization with parthenolide, we showed that NF- κ B mediates the CNI-induced synthesis of key proinflammatory cytokines and adhesion molecules in endothelium. Moreover, CNIs activated NF- κ B in the entire vascular wall, including VSMC. This is relevant for CNI toxicity since NF- κ B inhibition with parthenolide prevents experimental atherosclerosis and renal damage^{33,35,36}. Thus, synthetic or naturally occurring NF- κ B small molecule inhibitors should be explored to prevent CNI-induced vascular inflammation.

Increased activity or expression of TLRs, particularly TLR4, has been associated with vascular inflammation^{19,37,38}. In accordance with previous observations from our group on CNI-induced TLR activation in tubular cells, MyD88 silencing in endothelial cells prevented the induction of proinflammatory and endothelial activation markers by CsA and tacrolimus. MyD88 is an adaptor protein that participates in the formation of proximal complexes with TLR2 and TLR4^{12,39}. However, in our experiments, cultured endothelial cells did not respond to the TLR2 agonist lipoteichoic acid (data not shown). This allowed focusing research on the role of the TLR4 pathway in the proinflammatory effects of CNIs. Both pharmacological and genetic targeting of TLR4 confirmed its role in CNI-induced inflammatory responses in endothelial and vascular cells. Remarkably, TLR4 was also required for CNI-induced ET-1 gene expression. ET-1 is a potent vasoconstrictor peptide involved in hypertension⁴⁰. This result reinforces the idea of endothelial inflammation, activation and dysfunction being related phenomena in response to CNIs and disclosed a central role of TLR4 as a gatekeeper controlling all of these responses in vascular cells.

We also identified oxidative stress as a key event downstream of TLR4 in aortic endothelial and vascular cells exposed to CNIs. Oxidative stress contributed to the CNI-induced synthesis of proinflammatory mediators and endothelial stress markers. A pathway implying a TLR4-dependent ROS formation, NF- κ B activation and inflammation was reported in VSMCs subjected to AngII treatment^{18,23}. CsA is a well-known inducer of oxidative stress and cell damage in the vasculature, and notably, in renal tissue^{41,42}. Likewise, previous work from our laboratory showed that ROS mediate CsA-induced cell death in endothelial cells through activation of the JAK2/STAT3 pathway⁴³. Moreover, it is well known that JNK is activated by oxidative stress⁴⁴. In endothelial MS1 cells, both JAK2 and JNK are activated by CNIs and their inhibition results in the blockade of the CNI-provoked proinflammatory responses (data not shown). Downstream transcription factors of these protein kinases, namely STAT3 and AP-1, an even their activating protein kinases, interact with NF- κ B to activate inflammatory responses^{45–47}. Thus, our present results strongly suggest a role of redox imbalance and ROS generation in the TLR4-dependent signaling and NF- κ B-dependent inflammation.

The observation that vascular and kidney toxicity profiles of CsA and tacrolimus are similar in experimental models and humans, suggests that their interaction with calcineurin could be a common element involved in

the CNIs adverse effects. In endothelial cells, the interaction of CNIs with calcineurin is required for decreasing eNOS activity and NO content. However, calcineurin was dispensable to increase TGF β receptor expression and arteriolar hyalinosis or to potentiate the LPS-induced leukocyte binding to endothelium, as suggested by similar results obtained with rapamycin^{9,30,48}. In macrophages, unlike in T cells, calcineurin hindered NF- κ B and IRF activation by inhibiting TLR-mediated signaling through MyD88 and TRIF, and calcineurin targeting by genetic means or by CNIs resulted in increased synthesis of proinflammatory cytokines⁴⁹. In the present manuscript, unlike in macrophages, calcineurin deficiency did not increase proinflammatory factor secretion. By contrast, it partially inhibited but did not impede the overall CNI-induced proinflammatory response, suggesting that binding of CNIs to calcineurin may enhance the proinflammatory effect, but is not an absolute requirement. In accordance with this result, calcineurin deficiency mildly reduced evidence of NF- κ B activation at the I κ B α phosphorylation level, but this fact did not result in modification of p65 phosphorylation/activation. This observation is in agreement with the reported phosphorylation of p65 at Ser536 being independent of I κ B α ⁵⁰. Moreover, according to the proposed role of Ser536 p65 phosphorylation promoting inflammatory gene expression⁵¹, maintenance of Ser536 p65 phosphorylation was associated to a largely preserved inflammatory gene expression following CNI exposure. By contrast, our results revealed that calcineurin deficiency abolished the CNI-induced TRIF signaling. The TRIF pathway promotes sustained NF- κ B-dependent responses following TLR4/MyD88 signaling⁵². In this manner, we could envision a role of calcineurin suppressing long lasting activation of TLR4 and the loss of this inhibitory feedback as a possible mechanism contributing to exacerbation of CNI toxicity. Overall, this set of results show that calcineurin availability is not an absolute requirement, but it may contribute to CNI-induced proinflammatory events in endothelial cells. Thus, interaction with calcineurin could stabilize CNIs inside cells and increase toxicity.

In conclusion, we have shown that TLR4 mediates endothelial inflammation, activation and dysfunction induced by CNIs. These effects appear to be dependent on the TLR4/MyD88/NF- κ B and TLR4/TRIF/NF- κ B pathways and involved oxidative stress generation downstream of TLR4 and upstream of NF- κ B activation. Although calcineurin expression appeared to heighten CNI-mediated TLR4 signaling and hence NF- κ B-dependent cytokine and adhesion protein synthesis to some extent, this final proinflammatory effect was largely observed even in calcineurin-deficient cells. By contrast, results showed that TLR4 is an essential mediator of CNI proinflammatory effects in the vasculature. The association between TLR4 inactivation and improving of cardiovascular disease is becoming increasingly clear from a range of animal models dealing with this topic^{17,18,53,54}. Indeed, TLR4 blockade arises as potential therapy against many manifestations of transplant and CNI-associated vascular disease, including inflammation, hypertension and atherosclerosis. CNI immunosuppression is presently unavoidable to overcome allograft rejection, although prevention of CNI toxic side effects, including vascular toxicity, is yet an unmet necessity. Adjuvant therapies could be an acceptable strategy to improve immunosuppression based on CNIs. In such a way, TLR4 inhibition could be envisioned as a potential therapeutic approach for prevention of CNI-associated vascular toxicity after transplant.

References

- Valantine, H. Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: risk factors and management. *J Heart Lung Transplant*. **23**, S187–93 (2004).
- Al-Massarani, G. *et al.* Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am J Transplant*. **8**, 2360–7 (2008).
- Mitchell, R. N. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu Rev Pathol*. **4**, 19–47 (2009).
- Jiang, X., Sung, Y. K., Tian, W., Qian, J., Semenza, G. L. & Nicolls, M. R. Graft microvascular disease in solid organ transplantation. *J Mol Med (Berl)*. **92**, 797–810 (2014).
- Navarro-Antolin, J. *et al.* Role of peroxynitrite in endothelial damage mediated by Cyclosporine A. *Free Radic Biol Med*. **42**, 394–403 (2007).
- Redondo-Horcajo, M. *et al.* Cyclosporine A-induced nitration of tyrosine 34 MnSOD in endothelial cells: role of mitochondrial superoxide. *Cardiovasc Res*. **87**, 356–65 (2010).
- Ikezoe, T. *et al.* Thrombomodulin protects endothelial cells from a calcineurin inhibitor-induced cytotoxicity by upregulation of extracellular signal-regulated kinase/myeloid leukemia cell-1 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **32**, 2259–70 (2012).
- Amador, C. A. *et al.* Deletion of mineralocorticoid receptors in smooth muscle cells blunts renal vascular resistance following acute cyclosporine administration. *Kidney Int*. **89**, 354–362 (2015).
- Chiasson, V. L. *et al.* Endothelial cell transforming growth factor- β receptor activation causes tacrolimus-induced renal arteriolar hyalinosis. *Kidney Int*. **82**, 857–66 (2012).
- González-Guerrero, C. *et al.* Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF- κ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. **272**, 825–41 (2013).
- Kulkarni, O. P. *et al.* Toll-like receptor 4-induced IL-22 accelerates kidney regeneration. *J Am Soc Nephrol*. **25**, 978–89 (2014).
- Loiarro, M., Ruggiero, V. & Sette, C. Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases. *Mediators Inflamm*. **2010**, 674363 (2010).
- Tellides, G. & Pober, J. S. Inflammatory and immune responses in the arterial media. *Circ Res*. **116**, 312–22 (2015).
- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O'Neill, L. A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. **5**, 446–58 (2005).
- den Dekker, W. K., Cheng, C., Pasterkamp, G. & Duckers, H. J. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis*. **209**, 314–20 (2010).
- Cai, J. *et al.* HMGB1-driven inflammation and intimal hyperplasia after arterial injury involves cell-specific actions mediated by TLR4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **35**, 2579–93 (2015).
- De Batista, P. R. *et al.* Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS One*. **9**, e104020 (2014).
- Chen, J. *et al.* Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. **79**, 288–99 (2011).
- Sörensen, I. *et al.* B β (15–42) attenuates the effect of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. **22**, 1887–96 (2011).
- Hernanz, R. *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Br J Pharmacol*. **172**, 3159–76 (2015).

21. Berzal, S. *et al.* GSK3, snail, and adhesion molecule regulation by cyclosporine A in renal tubular cells. *Toxicol Sci.* **127**, 425–37 (2012).
22. Van der Heiden, K., Cuhlmann, S., Luong, Ie. A., Zakkar, M. & Evans, P. C. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin Sci (Lond)*. **118**, 593–605 (2010).
23. Rodrigues-Diez, R. R. *et al.* The C-terminal module IV of connective tissue growth factor, through EGFR/Nox1 signaling, activates the NF- κ B pathway and proinflammatory factors in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*. **22**, 29–47 (2015).
24. Yang, X. *et al.* Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **289**, H1069–76 (2005).
25. Youn, H. S. *et al.* Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol*. **175**, 3339–46 (2005).
26. Milan, D., Griffith, J., Su, M., Price, E. R. & McKeon, F. The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell*. **79**, 437–47 (1994).
27. Cardenas, M. E., Muir, R. S., Breuder, T. & Heitman, J. Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. *EMBO J.* **14**, 2772–83 (1995).
28. Savoia, C. & Schiffrin, E. L. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond)*. **112**, 375–84 (2007).
29. Liao, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest*. **123**, 540–1 (2013).
30. Rafiee, P. *et al.* Cyclosporine A enhances leukocyte binding by human intestinal microvascular endothelial cells through inhibition of p38 MAPK and iNOS. Paradoxical proinflammatory effect on the microvascular endothelium. *J Biol Chem*. **277**, 35605–15 (2002).
31. Sanz, A. B. *et al.* NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*. **21**, 1254–62 (2010).
32. Martin-Ventura, J. L. *et al.* Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke*. **36**, 1796–800 (2005).
33. López-Franco, O. *et al.* Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **26**, 1864–70 (2006).
34. Savoia, C. & Schiffrin, E. L. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **15**, 152–8 (2006).
35. Esteban, V. *et al.* Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol*. **15**, 1514–29 (2004).
36. Oguiza, A. *et al.* Peptide-based inhibition of I κ B kinase/nuclear factor- κ B pathway protects against diabetes-associated nephropathy and atherosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. **58**, 1656–67 (2015).
37. Zhao, H., Perez, J. S., Lu, K., George, A. J. & Ma, D. Role of Toll-like receptor-4 in renal graft ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. **306**, F801–11 (2014).
38. Bomfim, G. F. *et al.* Toll-like receptor 4 inhibition reduces vascular inflammation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. **122**, 1–7 (2015).
39. Mudaliar, H. *et al.* The role of TLR2 and 4-mediated inflammatory pathways in endothelial cells exposed to high glucose. *PLoS One*. **9**, e108844 (2014).
40. Raina, A., Horn, E. T. & Benza, R. L. The pathophysiology of endothelin in complications after solid organ transplantation: a potential novel therapeutic role for endothelin receptor antagonists. *Transplantation*. **94**, 885–93 (2012).
41. Redondo-Horcajo, M. & Lamas, S. Oxidative and nitrosative stress in kidney disease: a case for cyclosporine A. *J Nephrol*. **18**, 453–7 (2005).
42. Damiano, S. *et al.* Prevention of nephrotoxicity induced by cyclosporine-A: role of antioxidants. *J Cell Biochem*. **116**, 364–9 (2015).
43. Neria, F. *et al.* Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int*. **75**, 227–34 (2009).
44. Son, Y., Kim, S., Chung, H. T. & Pae, H. O. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol*. **528**, 27–48 (2013).
45. Meyer, C. F., Wang, X., Chang, C., Templeton, D. & Tan, T. H. Interaction between c-Rel and the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 signaling cascade in mediating kappaB enhancer activation. *J Biol Chem*. **271**, 8971–6 (1996).
46. Takemoto, Y. *et al.* Increased JNK, AP-1 and NF-kappa B DNA binding activities in isoproterenol-induced cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. **31**, 2017–30 (1999).
47. Utero, A. C. *et al.* A polymeric nanomedicine diminishes inflammatory events in renal tubular cells. *PLoS One*. **8**, e51992 (2013).
48. Kou, R., Greif, D. & Michel, T. Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J Biol Chem*. **277**, 29669–73 (2002).
49. Kang, Y. J. *et al.* Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways. *J Immunol*. **179**, 4598–607 (2007).
50. Sasaki, C. Y., Barberi, T. J., Ghosh, P. & Longo, D. L. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I κ B α -independent NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. **280**, 34538–47 (2005).
51. Zhao, Y. *et al.* Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation. *Diabetes*. **60**, 1907–16 (2011).
52. Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. **301**, 640–3 (2003).
53. Young, K. C. *et al.* Toll-like receptor 4-deficient mice are resistant to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Exp Lung Res*. **36**, 111–9 (2010).
54. Dange, R. B. *et al.* Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res*. **103**, 17–27 (2014).

Acknowledgements

We want to thank to Dr. Consuelo Guerri (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain) for kindly providing us with the TLR4^{-/-} mice for studies of CNI toxicity in aorta. This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía Competitividad, Gobierno de España): FEDER funds ISCIII RETIC REDINREN RD12/0021, PI11/02242, PI13/00047, PI14/0041, PI14/00386, PI15/01460; Comunidad de Madrid (CIFRA S2010/BMD-2378); Sociedad Española de Nefrología. Salary support: RR-D: CIFRA; CO-S: Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz; CG-G and RRR-D: REDINREN; AO: Programa Intensificación Actividad Investigadora (ISCIII/Agencia Lain-Entralgo/CM); JE and MRO: Universidad Autónoma de Madrid; AMR: Contrato Miguel Serve (ISCIII).

Author Contributions

R.R.-D. contributed to design experiments, performed and analyzed *in vitro* experiments, handled the animal models, made figures, performed experiments to revise the paper and contributed to write the paper; C.G.-G. performed experiments, handled the animal models, contributed to made figures, performed experiments to

revise the paper and managed the online submission. C.O.-S. developed and analyzed *in vitro* experiments; R.R.R.-D., gave technical support to perform the animal models; JE gave financial support to the research and revised the paper; A.O. and M.R.-O. gave financial and scientific support to the research and contributed to write the paper; A.M.R. conceived, planned and gave financial support to the project, performed experiments, analyzed the results and wrote the paper. All authors read and approved the final paper.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Rodrigues-Diez, R. *et al.* Calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus induce vascular inflammation and endothelial activation through TLR4 signaling. *Sci. Rep.* **6**, 27915; doi: 10.1038/srep27915 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

